

HERZGLYKOSIDREZEPTOREN BEI HYPOKALIÄMIE

*Bindungsstudien mit ^3H -g-Strophantin
an Erythrozyten, Herz- und Skelettmuskeln
von Meerschweinchen*

Gerhard WAGNER

*Diss
München
1985*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Medizinischen Klinik I
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Klinikum Großhadern

Direktor: Professor Dr. med. G. Riecker

HERZGLYKOSIDREZEPTOREN BEI HYPOKALIÄMIE

Bindungsstudien mit ^3H -g-Strophanthin
an Erythrozyten, Herz- und Skelettmuskeln
von Meerschweinchen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München
vorgelegt von

GERHARD WAGNER

aus Heidenheim

1985

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. E. Erdmann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. G. Riecker

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 0³. Oktober 1985

Für

Doris und Jasmin

	Seite
1. EINLEITUNG	1
1.1 Digitalistherapie 200 Jahre nach Withering	1
1.2 Wirkungsmechanismus der Herzglykoside	2
1.3 Das Herzglykosid-Rezeptor-(Na ⁺ +K ⁺)-ATPase-System	3
1.4 Die (Na ⁺ +K ⁺)-ATPase	4
1.5 Na ⁺ -Ca ⁺⁺ -Gegentransport	5
1.6 Die elektromechanische Kopplung	6
1.7 Kaliummangel und Herzglykosidwirkung	7
1.8 Ziel dieser Arbeit	11
2. MATERIAL UND METHODIK	12
2.1 Material und Abkürzungsverzeichnis	12
2.2 Methoden	14
2.2.1 Versuchstiere	14
2.2.2 Anaesthesie	14
2.2.3 Intracardiale Punktion	15
2.2.4 Blutgasanalyse	15
2.2.5 Kaliummessung	16
2.2.5.1 Serumkalium	16
2.2.5.2 Ganzkörperkalium	16
2.2.6 Proteinbestimmung	18
2.2.7 Statistik	18
2.3 Gewebepreparation	19
2.3.1 Isolierung der (Na ⁺ +K ⁺)-ATPase-haltigen Herzmuskelzellmembranen	19
2.3.2 Präparation verschiedener Homogenate	21
2.3.2.1 Herzmuskel	21
2.3.2.2 Skelettmuskel	22
2.3.3 Isolierung von Erythrozyten	23
2.4 Bestimmung der (Na⁺+K⁺)-ATPase-Aktivität	24
2.4.1 Prinzip des optisch-kinetischen Tests	24
2.4.2 Aktivitätsmessung in Zellmembranpräparationen	26
2.4.3 Zeitabhängiger Verlauf der Aktivität	28
2.5 Bestimmung der ³H-g-Strophanthinbindung an Rezeptoren	28
2.5.1 Filterverfahren und Probenaufbereitung	28
2.5.2 Definition der unspezifischen Bindung	30
2.5.5 Definition der spezifischen Bindung	31
2.5.4 Bestimmung des maximal vorhandenen ³ H-g-Strophanthins	31
2.6 Ansätze der Bindungsstudien	31
2.6.1 Assoziation: Zeitabhängige Bindung	31
2.6.2 Dissoziationskonstante: Konzentrationsabhängige Bindung	31
2.6.3 Dissoziation: Zeitabhängige Bindungsabnahme	32
2.6.3.1 Präparation des ³ H-g-Strophanthin-Rezeptor- Komplexes	32
2.6.3.2 Messung der Dissoziation des ³ H-g-Strophanthin- Rezeptor-Komplexes	33
2.7 Pharmakodynamische Untersuchungen an elektrisch stimuliert schlagenden Herz- und Skelettmuskeln	34
2.7.1 Präparation der Vorhöfe, Papillar- und Skelettmuskeln	34
2.7.2 Nährlösungen für Kontraktionsversuche	35
2.7.3 Messung der Kontraktionskraft von Herz- und Skelett- muskeln bei elektrischer Stimulation	35

3.	ERGEBNISSE	Seite 41
3.1	Charakterisierung des Rezeptors	41
3.1.1	Spezifische und unspezifische Bindung von ^3H -g-Strophanthin an isolierte Zellmembranen	41
3.1.2	Zeitabhängige Bindung von ^3H -g-Strophanthin an Herzmuskelzellmembranen	43
3.1.3	Temperaturabhängigkeit der Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{+1}	43
3.1.4	Temperaturabhängigkeit der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{-1}	44
3.1.5	Bestimmung der temperaturabhängigen Dissoziationskonstanten K_D mit drei verschiedenen Methoden	45
3.1.6	Thermodynamische Eigenschaften der g-Strophanthin-Rezeptorbindung	48
3.1.6.1	Thermodynamik im Gleichgewichtszustand	49
3.1.6.2	Thermodynamik im Übergangszustand	52
3.2	Die Wirkung von Kalium auf die g-Strophanthin-Rezeptorbindung	64
3.3	Bindungsstudien und Kontraktionsversuche bei Kaliummangel	73
3.3.1	Abhängigkeit der Herzglykosid-Rezeptorbindung von Lebensalter und pH-Wert	73
3.3.2	Körpergewicht und Kaliumgehalt nach kaliumarmer Diät	75
3.3.3	Konstante Herzglykosidrezeptorzahl am Herzmuskel trotz Hypokaliämie	76
3.3.4	Wirkung von g-Strophanthin auf die Kontraktionskraft schlagender Vorhof- und Papillarmuskeln nach kaliumarmer Diät	85
3.3.5	Verringerte Herzglykosidrezeptorenzahl am Skelettmuskel bei Kaliummangel	91
3.3.6	Erhöhte Herzglykosidrezeptorenzahl in der Erythrozytenmembran durch Hypokaliämie	98
4.	DISKUSSION	101
4.1.	Pathophysiologie und klinische Auswirkungen des allgemeinen Kaliummangels	101
4.1.1	Ätiologie	101
4.1.2	Kaliumhaushalt	102
4.1.3	Säure-Basen-Haushalt	104
4.1.4	Pathophysiologie und Symptome	105
4.1.5	Pharmaka und Wirkungsänderung	107
4.2	Der Herzglykosid-Rezeptor	109
4.2.1	Eigenschaften	109
4.2.2	Untersuchungsmethoden	110
4.2.3	Bindungskinetik	111
4.2.4	Thermodynamik	112
4.2.5	Kaliumeinfluß	120
4.3	Hypokaliämie und Pharmakodynamik	122
4.3.1	Bindungseigenschaften im subakuten Kaliummangel	122
4.3.2	Rezeptordichte und Aktivität	125
4.3.3	Auswirkungen auf den pharmakologischen Effekt	132
4.3.4	Mechanismus der gesteigerten Digitalisempfindlichkeit bei Hypokaliämie	137

5.	ZUSAMMENFASSUNG	Seite 140
6.	VERZEICHNISSE	
6.1.	Abbildungen	143
6.2.	Tabellen	145
6.3.	Literatur	146
7.	DANKSAGUNG	169
8.	LEBENS LAUF	170

1. EINLEITUNG

1.1 DIGITALISTHERAPIE 200 JAHRE NACH WITHERING

Der englische Arzt William Withering beschrieb schon vor 200 Jahren die Wirkungen und Nebenwirkungen der Fingerhutextrakte. Home, sein Lehrer, verwandte Digitalis, um Erbrechen zu erzielen und machte sich nur deren Nebenwirkungen zunutze.

Withering aber hatte herausgefunden, daß mit Herzglykosiden der Wassersucht beizukommen ist. 10 Jahre lang hat er therapeutische Studien an verschiedenen Herzkranken angestellt, aber erst 1785 fand er den Mut, seine Erfahrungen über den Wert der Digitalistherapie in einer berühmt gewordenen Monographie zu publizieren (262).

Herzglykoside würden, wollte man sie heutzutage in die Therapie einführen, wegen ihrer starken Toxizität und geringen therapeutische Breite mit großer Wahrscheinlichkeit als Arzneimittel nicht zugelassen werden (119).

200 Jahre nach der ersten klinischen Erforschung durch Withering stehen Herzglykoside in der Häufigkeit der Verordnungen an der Spitze des deutschen Arzneimittelmarktes.

Tabelle 1: Zahl der Verordnungen (V) der drei am häufigsten verschriebenen Präparate in Deutschland 1982 (121)

Arzneimittel	Mio.(V)
1. Novodigal	8.74
2. Lanitop	6.89
3. Lexotanil 6	5.36

Allein der Marktführer Novodigal hat einen Jahresumsatz von 50 Mio. DM (121, 226).

Die hohe Zahl der Verordnungen für Herzglykoside in der BRD liegt weit über denjenigen vergleichbarer Länder (97, 171, 212, 213).

Ein Grund für den tonnenweisen Verbrauch an Herzglykosiden in Deutschland ist deren prophylaktische Applikation. Es wird zu Recht postuliert, eine Herzglykosidtherapie nur bei gesicherter Indikation durchzuführen, da eine therapeutische Wirkung bei digitalisierten Patienten ohne Herzinsuffizienz in Langzeitstudien nicht erwiesen ist (97, 211, 242).

1.2 WIRKUNGSMECHANISMUS DER HERZGLYKOSIDE

Bei der Erforschung des genauen Wirkungsmechanismus der Herzglykoside sind fast alle zellulären Kompartimente schon einmal verdächtigt worden, der primäre Angriffspunkt der Herzglykoside zu sein (77, 99, 107, 128, 132, 196, 254). Bis heute konnte, trotz einer wahren Flut wissenschaftlicher Veröffentlichungen zu diesem Thema, der genaue Mechanismus der positiv inotropen Wirkung nicht hinreichend erklärt werden.

Heutzutage stellt man sich den Wirkungsmechanismus der Herzglykoside etwa folgendermaßen vor:

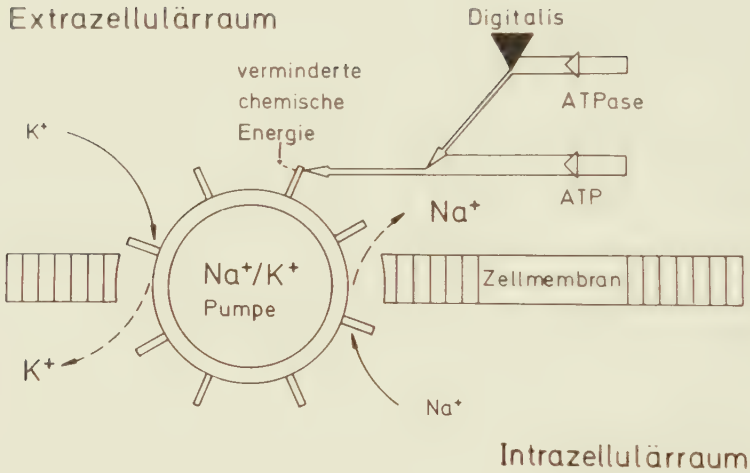
1. Bindung des Herzglykosidmoleküls an den spezifischen Rezeptor
2. Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) \text{-ATPase}$
3. Intrazelluläre Akkumulation von Natrium
4. Stimulation des $\text{Na}^+ \text{-Ca}^{2+}$ -Gegentransportsystems
5. Erhöhung der intrazellulären Ca-Konzentration
6. Aktivierung der kontraktilen Proteine

Digitalis wirkt also über das Freisetzen von zusätzlichem Kalzium am geschwächten Herzmuskel. Dieses "Extra-Kalzium" induziert, gleich einem Zündfunken, die ATP-Spaltung. Die dadurch freigesetzte Energie bewirkt die Muskelkontraktion.

1.3 DAS HERZGLYKOSIDREZEPTOR-(Na⁺+K⁺)-ATPase-SYSTEM

Herzglykosidbindungsstellen befinden sich auf der Membranaußenseite (45, 127, 181, 199, 216, 218, 228, 238), da mit an Albumin gebundenem Digoxin ein positiv inotroper Effekt nachgewiesen werden konnte, obwohl ein intrazelluläres Eindringen solch großer Moleküle unmöglich ist (195). In jüngster Zeit gibt es aber auch Hinweise auf eine Wirksamkeit von intrazellulär applizierten Herzglykosiden (131). Skou entdeckte bereits 1957 ein Leitenzym für Zellmembranen, welches Na⁺ aus der Zelle und K⁺ in die Zelle pumpt (235). Als Folge dieser Pumpleistung ist im Zellinneren die K⁺-Konzentration rund 50 mal höher, die Na⁺-Konzentration aber 10 mal niedriger, als außen. Da diese Membranpumpe ATP spaltet und durch Na⁺ und K⁺ aktivierbar ist, nannte er das isolierte Enzym "Na⁺+K⁺-ATPase". Herzglykoside hemmen diese Na⁺+K⁺-ATPase und damit den aktiven Na⁺/K⁺-Transport der Zellmembran (61, 114, 221, 228). Dadurch ist eine Zunahme der intrazellulären Natriumkonzentration bedingt. Das Transportenzym wird als Digitalisrezeptor postuliert (3, 4, 115, 205, 229).

Extrazellulärraum



Intrazellulärraum

Abb. 1: Wirkweise von Digitalis an der Herzmuskelzelle (130, 189).

1.4. DIE $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase

Aufgrund biochemischer Analysen mit radioaktiv markierten Aminosäuren ist folgendes Modell der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase wahrscheinlich. Von dem Enzym wird angenommen, daß es ein Dimer mit einem Molekulargewicht von etwa 280.000 ist. Jedes Monomer besteht aus zwei Untereinheiten. Das α -Protein, mit einem Molekulargewicht von 90.000-100.000, durchspannt die Zellmembran und fungiert an seiner Außenseite wahrscheinlich als Bindungsstelle für Herzglykoside (105, 136, 160, 179, 180, 201, 218, 237, 240).

Intrazellulär stellt es das aktive Zentrum für die ATP-Hydrolyse dar. Die β -Untereinheit ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 45.000 mit ungeklärter Funktion. Na^+ - und K^+ -Transport sind gekoppelt und erfolgen in entgegengesetzter Richtung. Pro hydrolysiertem ATP werden zwei K^+ -Ionen in die Zelle hinein und drei Na^+ -Ionen herausgepumpt.

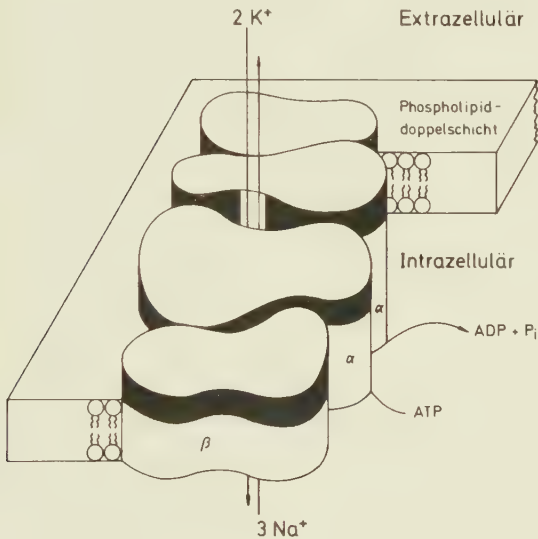


Abb. 2: Modell der (Na^+/K^+)-ATPase-Struktur (137)

1.5 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ -GEGENTRANSPORT

Herzglykoside bewirken durch Hemmung des aktiven Na^+/K^+ -Transports eine Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentration (62, 163). Diese stimuliert einen energieunabhängigen elektroneutralen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ -Carrier über den vermehrt Calcium einwärts transportiert wird (25, 26, 113, 156, 157). Bei

diesem $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{++}$ -Gegentransport werden zwei Na^+ gegen ein Ca^{++} ausgetauscht (118). Die Akkumulation von intrazellulärem Calcium (155, 158) aktiviert verstärkt das Actomyosinsystem und führt somit zum positiv inotropen Effekt.

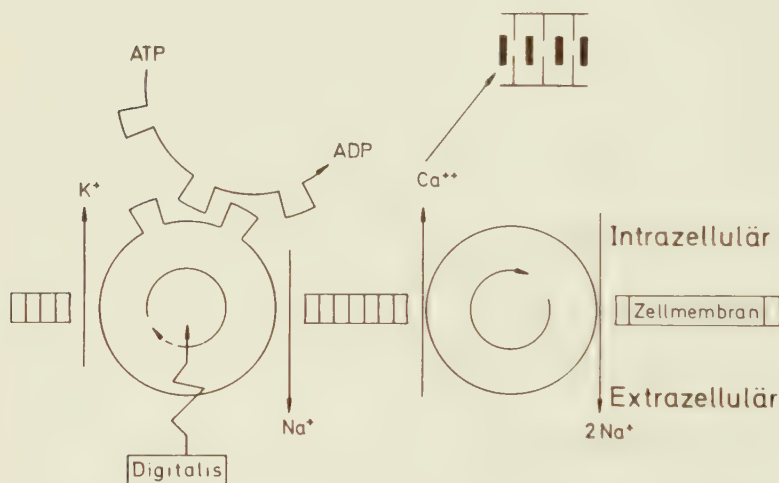


Abb. 3: Modell des transmembranösen Calcium-Transports, ausgelöst durch Herzglykoside (31)

1.6. DIE ELEKTRO-MECHANISCHE KOPPLUNG

Calcium ist das Kopplungsglied zwischen der Depolarisation der Herzmuskelfasermembran und der Kontraktion der Myofibrillen (106). Die Muskelkontraktion erfolgt durch ein Aneinandergleiten von Actin und Myosinfilamenten (Gleitendes Filament-Modell). Hierbei bleiben sie selbst in ihrer Länge unverändert. Die Regulatorproteine Troponin und Tropomyosin blockieren im Ruhezustand eine Wechselwirkung zwischen Myosin und Actin.

Erst durch die Bindung von Calcium an Troponin wird die Position von Tropomyosin so verändert, daß sich der Myosinkopf an das Actinfilament anlagern kann (182). Der so entstandene Actomyosinkomplex wird durch ATP gespalten. Dies bewirkt eine Lageveränderung des als Querbrücke dienenden Myosinkopfes. Es resultiert die Muskelkontraktion.

1.7 KALIUMMANGEL UND HERZGLYKOSIDWIRKUNG

Störungen im Kaliumhaushalt können zu folgenschweren Funktionsstörungen, insbesondere des Herzens führen. Bei Hypokaliämie soll eine gesteigerte Digitalisempfindlichkeit bestehen (16, 28, 133). Diese Auffassung wird durch neuere klinische Untersuchungen gestützt, die das Auftreten von Herzrhythmusstörungen bei Digitalisspiegeln im "therapeutischen Bereich" beschreiben (247). Nach Beseitigung der Hypokaliämie verschwanden auch die Arrhythmien wieder (231). Nicht nur bei Patienten, auch tierexperimentell wurde eine gesteigerte Digitalisempfindlichkeit bei niedrigen Kaliumkonzentrationen festgestellt (164). Chronischer Kaliummangel bei Hunden senkt z. B. die Schwelle zur Arrhythmie und verringert den positiv inotropen Effekt von Digoxin (122). Die geringere Glykosidtoleranz unter Hypokaliämiebedingungen kann möglicherweise durch veränderte Bindungsverhältnisse erklärt werden.

Das Verhalten der Bindungsstellen bei Hypokaliämie wurde in zahlreichen Veröffentlichungen dokumentiert und die Herzglykosidrezeptoren verhielten sich zahlenmäßig folgendermaßen:

1. Zunahme: Eine Erhöhung der ^3H -g-Strophanthin-Bindungs-
kapazität durch Hypokaliämie wurde gefunden an Erythrozyten
von Patienten (88, 102, 217, 224), an Herzmuskelzellmembranen
von Kaninchen (202) und in Kulturen von HeLa- (202) oder
Hühnerherzzellen (144, 259).

2. Konstanz: Im Unterschied dazu wurde an Skelettmuskelzell-
membranen des Musculus quadriceps von Kaninchen keine Ver-
änderung der Bindungskapazität für g-Strophanthin beobachtet
(253).

3. Abnahme: Eine andere Arbeitsgruppe konnte am M. soleus von
Ratten nach dreiwöchiger Hypokaliämie sogar eine deutliche
Reduktion um bis zu 78 % der g-Strophanthin-Rezeptoren nach-
weisen (148, 190).

Diese unterschiedlichen Ergebnisse wurden an so verschieden-
artigen Spezies wie Meerschweinchen (27, 81), Kaninchen (253),
Ratte (144, 190), Huhn (144, 259) und Mensch (88, 102, 217,
224) gewonnen, daß sie auch das Resultat spezifischer Regu-
lationsmechanismen der jeweils untersuchten Gewebe sein könn-
ten. Deshalb führten wir unsere Untersuchungen ausschließlich
an einer Tierart, dem Meerschweinchen durch.

Bei der Auswahl der Organe orientierten wir uns an den Resul-
taten der bisherigen Veröffentlichungen und entschieden uns
für Experimente an Erythrozyten, Herz- und Skelettmuskeln, die
unterschiedlich auf Hypokaliämie reagieren können:

Erythrozyten, weil an Erythrozytenmembranen von Patienten mit
chronischer Hypokaliämie (Diuretikatherapie, Laxantienabusus,
Morbus Crohn u. a.) (88, 102, 217, 224) und kaliumverarmten

Ratten (47), die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität bzw. die Glykosid-rezeptoren pro Erythrozyt erhöht waren.

Skelettmuskel, weil eine Abnahme der Herzglykosidrezeptoren durch Hypokaliämie, wie sie am Skelettmuskel von Ratten bereits nachgewiesen wurde (190), erhebliche Verteilungsprobleme für Digitalis erwarten läßt. Insbesondere deshalb, weil der Skelettmuskel etwa 50 % des Gesamtkörperdigoxins enthält (135) und er somit das größte Glykosiddepot des Körpers ist (256).

Herzmuskel, weil an ihm eine signifikante Zunahme der Glykosidrezeptoren (94) bzw. $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität (27, 81) bei chronischer Hypokaliämie von mehreren Autoren an Kaninchen (253), Meerschweinchen (27, 81) und Zellkulturen von Hühnerembryos (144, 259) beschrieben ist. Entsprechend diesen Befunden konnte im chronischen Kaliummangel auch ein niedrigeres intrazelluläres Natrium und ein höheres intrazelluläres Kalium nachgewiesen werden (246). Zudem stellt der Herzmuskel den eigentlichen Angriffspunkt der therapeutischen, aber auch der toxischen Digitaliswirkung dar und ist deshalb von besonderem klinischen Interesse.

Wenn sich die Zahl der Herzglykosid-Rezeptoren und die Eigenschaften der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Moleküle bei Kaliummangel verändern können, stellt sich die Frage, ob hierdurch auch die Pharmakodynamik herzwirksamer Glykoside beeinflusst wird.

Anhand der Dosis-Wirkungskurven von Herzglykosiden an elektrisch gereizt schlagenden Vorhof-, Papillar- und Skelettmuskeln sollte überprüft werden, ob Hypokaliämie sich direkt auf die Kontraktionskraftzunahme auswirkt. Eine Änderung der

Pharmakodynamik läßt sich auch durch eine Affinitätsänderung des Herzglykosid-Rezeptors erreichen. Eine erhöhte Herzglykosid-Rezeptoraffinität unter Hypokaliämiebedingungen könnte die Dosis-Wirkungskurve zu niedrigeren Digitaliskonzentrationen verschieben.

Erschwert wird die Interpretation der gesteigerten Digitalisempfindlichkeit dadurch, daß Hypokaliämie ebenso wie hohe Kalziumspiegel auch ohne Digitaliszugabe arrhythmogen wirken können (250, 30). Experimentell wurde unter Kaliummangel eine gesteigerte Digitalisbindung an Herzmuskelzellmembranen nachgewiesen (86, 184). Umgekehrt zeigten Bindungsstudien mit radioaktiv markiertem Strophanthin, daß eine Kaliumerhöhung an Purkinje-Fasern zu einer Rückbildung der elektrophysiologischen Veränderungen führt (9). Kalium hat also eine digitalisantagonistische Wirkung (5, 10, 86, 90) und stellt bei nicht lebensbedrohlichen Herzglykosidintoxikationen ein Therapeutikum dar (100). Deshalb untersuchten wir auch den Einfluß von Kaliumionen auf den Herzglykosid-Rezeptor an Herzmuskelzellmembranen von Meerschweinchen.

Zur Charakterisierung des Herzglykosid-Rezeptors sind noch weitere Faktoren, die eine Digitalisbindung beeinflussen können, wie pH-Verschiebungen, Thermodynamik im Gleichgewichts- und Übergangszustand und Änderungen der Temperatur überprüft worden.

1.8 ZIEL DIESER ARBEIT

Die Untersuchungen sollten Antwort auf folgende Fragen geben:

1. Verändert sich die Zahl der Bindungsstellen oder deren Affinität für Herzglykoside an Erythrozyten, Herz- oder Skelettmuskeln von Meerschweinchen durch Kaliummangel?
2. Wird hierdurch die Pharmakodynamik der herzwirksamen Glykoside unter Hypokaliämiebedingungen beeinflusst?
3. Welche Mechanismen sind verantwortlich für eine Digitalis-überempfindlichkeit bei Patienten mit Kaliummangel?

2. MATERIAL UND METHODIK

2.1 MATERIAL UND ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Bezug	Substanz	Abkürzung
New England Nuclear 6072 Dreieich	- ³ H-g-Strophanthin Lot-No. 1162-062 (14-20 Ci/mMol)	
C.F. Boehringer 6800 Mannheim	-g-Strophanthin (MG: 727.2) -Pyruvat (200 U/mg Protein) -Lactatdehydrogenase (450 U/mg Protein) -Adenosintriphosphat als Dinatriumsalz -Phosphoenolpyruvat -Nicotinamidadenin- dinucleotid	PK LDH ATP PEP NADH
E.Merck AG 6100 Darmstadt	-Tris(hydroxymethyl)- aminomethan -Äthylendiamintetra- acetat -Natrium-Desoxycholat	Tris EDTA DOC
Behringwerke AG 3550 Marburg	-Rinderserumalbumin (100 % rein)	
W. Zinser Analytik GmbH 6000 Frankfurt	-Quickszint 501 - -Unisolve 1 - Szintillationsflüssigkeit	
Parke,Davis & Company	-Ketanest ^R -Anästhetikum	

Alle anderen Chemikalien, Reinheitsgrad pro analysi, wurden von Boehringer, Mannheim, oder E. Merck, Darmstadt, bezogen. Für die Versuche fand ausschließlich Aqua bidest Verwendung.

Folgende Geräte wurden eingesetzt:

Hersteller	Geräte
BB Electronic Laichingen	Kraftaufnehmer BB Transducer Typ FU 10 PC
Beckmann Instruments GmbH 8000 München 40	Ultrazentrifuge L5-50 Rotor Typ 35 Ti
BF- Vertriebs-GmbH 8000 München	Szintillationszählgerät BF Betaszint 5000

B. Braun Melsungen AG 3508 Melsungen	-Schüttelwasserbad Typ 851502 -Glas-Homogenisatoren mit Teflonkolben
Clinicon Mannheim GmbH 6800 Mannheim	Hämatologie-Zählgerät HC 222 Counter
Eppendorf Gerätebau 2000 Hamburg 63	-Photometer 1101 M Küvettenwechselautomatik 2705 Thermostat 2761 Kompensationsschreiber 6511 -Flammenphotometer FL 52 -Tischzentrifuge 3200
Frieseke & Höpfner	Bodycountersonde
Gould-Instruments Cleveland, Ohio, U.S.A.	Gould-2400-Schreiber
Grass-Instrument Company Quincy, Mass., U.S.A.	Stimulator S 88
Hellige GmbH 7800 Freiburg im Breisgau	-Hellige Recomed 8-Kanal-Schreiber -Vorverstärker TF 19
Heraeus-Christ	Labofuge II
Hewlett Packard GmbH 8000 München	-Calculator 9830 A -Calculator-Plotter 9862 A -Printer 9866 A
Janke & Kunkel KG IKA-Werk Staufen im Breisgau	-Rührwerk Typ RW 24 -Dispergiergerät Ultra-Turrax Typ TP 18-10
Millipore GmbH 6078 Neu-Isenberg	Zwölffachfiltrationsgerät 1225
Packard Instruments Co. Inc. 2200 Warrenville RD	Szintillationszählgerät Packard Tricarb 2660
Radiometer Copenhagen/Dänemark	Blutgasanalysator ABL 1 Acid-Base
Sartorius Werke 3400 Göttingen	-Präzisionswaage Typ 2254 -Analysenwaage Typ 2494
Teletyp Corporation	Teletyp-Drucker 3320
Tektronix Portland/U.S.A.	-Generator-Waveform Type 162 -Generator-Pulse Type 161
Wiss.-Techn. Werkstätten 8120 Weilheim	pH-Digi 510

2.2 METHODEN

2.2.1. VERSUCHSTIERE

Als Versuchstiere dienten etwa 30 Wochen alte Meerschweinchen (weiß, männlich, Gewicht > 500 g).

Nahrung:

Bezug	Futtermittel	Kaliumgehalt
Altromin GmbH D 4937 Lage/Lippe	Standart-Diät 3020 Sonder-Diät C 3037 Kontroll-Diät C 3000	normal minimal normal
Boehringer Ingelheim KG 6507 Ingelheim am Rhein	Berodiät V Energiekomponente (E) Proteinkomponente (P1) Mineralstoffkomponente (M2)	kaliumfrei

Fütterung und Leitungswasser ad libitum.

2.2.2 ANAESTHESIE

Da beim Meerschweinchen zur Blutgewinnung intracardial punktiert werden muß, war eine Ausschaltung der Schmerzwahrnehmung anzustreben. Als Kurznarkotikum wurde Ketamin eingesetzt, da es eine komplette Analgesie bei nur oberflächlichem Schlaf gewährleistet (125). Diese besonders schonende Anaesthesieform wird wegen der nur geringen Atemdepression bevorzugt bei Kindern eingesetzt (22). Jedem Tier wurden 2-3 mg Ketanest^R intramuskulär injiziert. Die Narkosewirkung tritt nach 5 min. ein und hält etwa 10 min. an. Im Gegensatz zur Anaesthesie beim Menschen sind bei diesem Versuchsteil die Nebenwirkungen des Medikaments von Vorteil. Anstieg von Blutdruck und Herzfrequenz ermöglichen eine exaktere Lokalisation des Herzens bei der Palpation.

2.2.3 INTRACARDIALE PUNKTION

Material:

2ml Einmalspritzen aus Polypropylen

Kanülen Pravazgröße 1

Ketanest-Narkotikum

Heparin-Na.

Nach Wirkungseintritt von Ketanest^R wurde das Tier auf den Rücken gelegt und nach sorgfältiger Herzpalpation punktiert. Um arterielles Blut aus dem linken Ventrikel zu erhalten, mußte linksseitig transversal eingegangen werden. Ansonsten wurde senkrecht parasternal punktiert, da hierbei die Gefahr einer Lungenperforation geringer ist. Das gewonnene Blut wurde durch Zusatz von einem Tropfen Heparin-Na ungerinnbar gemacht. Die Kanülen Nr. 1 sind in Relation zum Meerschweinchenherzen sehr groß und so kann es nach der Punktion zu einem Hämopericard bzw. zu einer Herzbeuteltamponade kommen. Diese Kanülengröße ist aber erforderlich, da bei kleinerem Lumen das Blut aspiriert werden muß, was zur Erhöhung des Kaliumwertes im Serum führt.

2.2.4 BLUTGASANALYSE

Um zu überprüfen, ob die kaliumarme Ernährung bei den Tieren eine metabolische Alkalose bedingt, wurden pH-Messungen durchgeführt. Hierbei mußte zur Gewinnung von arteriellem Blut der linke Ventrikel punktiert werden. Für eine pH-Messung benötigt man 0,5 - 1,0 ml Blut. Sofort nach der Punktion wurde die Kanüle abgeknickt, so daß die Spritze luftdicht verschlossen war und unter Eiskühlung zum Meßgerät transportiert. Alle pH-Messungen wurden auf einem Blutgasanalysator AB/L1 Acid Base (Radiometer, Copenhagen) durchgeführt. Vor Einspritzen in das Gerät wurde die Anfangsportion verworfen.

2.2.5 KALIUMMESSUNG

Die Kaliumwerte wurden vor und nach der verordneten Diät sowohl im Serum als auch im Gesamtkörper bestimmt.

2.2.5.1 SERUMKALIUM

Wie unter 2.2.3 ausgeführt, wurde intracardial Blut abgenommen, da auf andere Weise gewonnenes Blut zu hohe Kaliumwerte liefert. Dieses venöse Blut wurde mit Heparin-Na ungerinnbar gemacht, in Eis gelagert und innerhalb von 15 min. in einer Eppendorf Tischzentrifuge 3200 2 min. bei Höchstgeschwindigkeit abzentrifugiert. Aus dem überstehenden Serum wurden 50 μ l entnommen und in 10 ml Lithium-Nulllösung pipettiert. Mit einem Eppendorf Flammenphotometer FL 52 wurde in dieser Lösung der Serumkaliumwert als mval/l bestimmt.

2.2.5.2 GANZKÖRPERKALIUM

^{40}K ist radioaktiv und mit etwa 0.012 % im natürlichen Kalium enthalten. Es zerfällt mit einer Halbwertszeit $T_{1/2}$ von etwa 10^{+9} Jahren und so hat ein Ganzkörperkalium von 150 g etwa eine Aktivität von 10 nCi. Mit externer Sonde ist ^{40}K nur nachweisbar, weil in 11 % aller ^{40}K -Zerfälle ein Gammaquant mit 1,460 MEV ausgesandt wird.

Für eine ordnungsgemäße Messung müssen vier Bedingungen erfüllt werden:

1. Der Meßraum selbst muß gegen die natürliche Untergrundstrahlung abgeschirmt sein. In Großhadern steht ein "Low level" Ganzkörperzähler zur Verfügung; der gesamte Meßraum ist mit 10 mm Blei und 150 mm aktivitätsarmem Eisen abgeschirmt.
2. Die Sonde muß ein ausreichendes Volumen aufweisen, um die harte 1.46 MeV Gammastrahlung absorbieren zu können. Als Sonden wurden vier Natriumiodid-Szintillationsdetektoren mit 5 Zoll Durchmesser und 4 Zoll Dicke verwendet.
3. Die Sondensignale müssen in einem Spektrometer energieselektiv verarbeitet werden, um die 1.46 MeV-Linie aus dem, auch im abgeschirmten Meßraum vorhandenen, Untergrund herauszufiltern. Die Signale der Sonden wurden in einem Vielkanalanalysator nach Energien sortiert. Der Untergrund im gewählten ^{40}K -Fenster betrug 0.4 Ereignisse/sec. je Detektor.
4. Die Sonde selbst muß kaliumarm sein.

MEßVERFAHREN BEI MEERSCHWEINCHEN

Die Meerschweinchen wurden paarweise mit 2 opponierenden Sonden gemessen. Ein Meßpaar wog zusammen ungefähr 1000 g, gerade genug, um sich mit ihrer Gammastrahlung von der Untergrundstrahlung abzuheben.

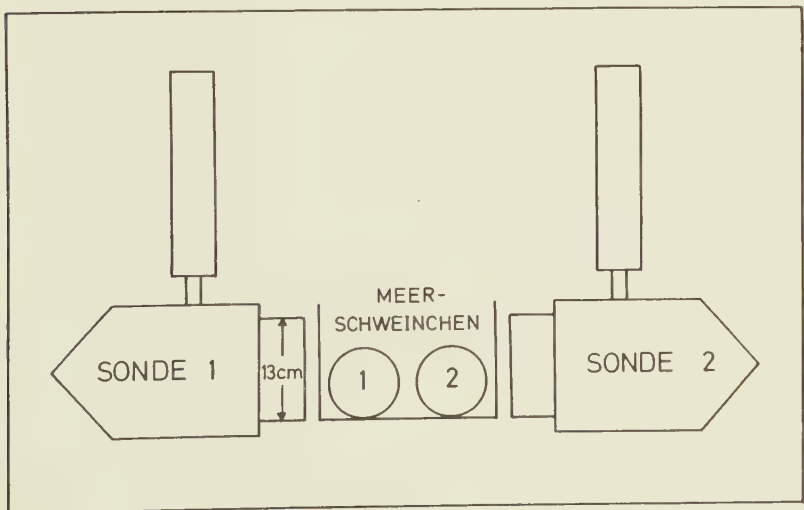


Abb.4: Versuchsaufbau zur Gesamtkörperkaliumbestimmung von Meerschweinchen

Zur Kalibrierung von gezählten Impulsen pro g Kalium wurden in gleicher Meßgeometrie 2 Flaschen mit KCl-Lösung mit einem Gesamtkaliumgehalt von 25.7 g gemessen.

Der Kalibrierfehler war 7.35 Impulse/g Kalium x min.

Die Meßzeit betrug pro Tierpaar 2400 sec.

2.2.6 PROTEINBESTIMMUNG

Nach dem Verfahren von Lowry et al. (172) wurde der Proteingehalt der Membranpräparation mit Folinreagenz bestimmt. Als Standard diente Rinderserumalbumin; die Extinktion wurde bei 578 nm gemessen.

2.2.7 STATISTIK

Die Ergebnisangabe erfolgt als arithmetischer Mittelwert, bei drei oder mehr Bestimmungen als Mittelwert $\pm$ SEM, nach allgemein üblichen Kriterien (139). Nach der Zusammenfassung der Einzelwerte zu einem Mittelwert wurde geprüft, ob die Zahlengruppe Ausreißer enthält. Hierbei fand der Nalimov-Test Anwendung. Dessen Einsatz gewährleistet ein ausreißerfreies Datenmaterial, das Voraussetzung ist für den Vergleich von Mittelwerten mit t-Test-Verfahren. Bei Prüfungen an identischen Tieren wurde mit dem t-Test für verbundene Stichproben die Mittelwerte beurteilt (Tab.9,11). Ansonsten wurde der Vergleich von Mittelwerten mit dem t-Test für unverbundene Stichproben durchgeführt.

2.3 GEWEBEPRÄPARATION

Alle Präparationsschritte wurden unter Eiswasserkühlung bei 0°C durchgeführt, wobei die verwendeten Lösungen und Behälter vorgekühlt waren. Zum Zentrifugieren wurde eine Beckmann Ultrazentrifuge L5-50 mit dem Rotor Typ 35Ti benutzt, zum Homogenisieren ein Glas/Teflon-Potter von Braun-Melsungen.

Lösungen für die Präparation:

1. Saccharose-EDTA-Lösung
0.25 M Saccharose, 1 mM EDTA-Lösung
neutralisiert mit Imidazol ad pH 7.0
2. EDTA-Lösung
1 mM EDTA-Lösung
mit Imidazol auf pH 7.0 gepuffert
3. DOC-Lösung
5% Desoxycholat-Lösung
4. NaJ-Lösung
6 M NaJ-Lösung
5. MgCl_2 -Lösung
0.1 M MgCl_2 -Lösung

2.3.1 ISOLIERUNG DER $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase HALTIGEN

HERZMUSKELZELLMEMBRANEN

20 Meerschweinchen wurden durch Genickschlag getötet. Die Herzen (zusammen ca. 100 g Feuchtgewicht) wurden rasch entnommen, sorgfältig von Vorhöfen, anhängendem Bindegewebe und Gefäßen befreit und bei -40°C bis zur Weiterverarbeitung eingefroren. Zur Membranpräparation wurden die Herzen im Wasserbad bei Zimmertemperatur rasch wieder aufgetaut und in ca. 150 ml Saccharose-EDTA-Lösung mit einem Mixer (Fa. Braun, Melsungen) 25 sec. bei Höchstgeschwindigkeit zerkleinert. Nach Zugabe von weiteren 150 ml Saccharose-EDTA-Lösung wurde dieses Gemisch 45 sec. im Mixer homogenisiert und mit obiger Lösung auf 400 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Der dickflüssige Brei wurde

anschließend bei 12.000 Upm 15 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und verworfen, das Sediment in 250 ml Saccharose-EDTA-Lösung gelöst, mit dem Mixer 60 sec. bei Höchstgeschwindigkeit homogenisiert und innerhalb einer Minute tropfenweise mit 20 ml DOC-Lösung versetzt. Dieses Gemisch wurde 20 min. im Kühlraum bei 0°C gerührt und danach 30 min. bei 25.000 Upm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand mit EDTA-Lösung auf 400 ml aufgefüllt und 90 min. bei 30.000 Upm erneut zentrifugiert. Das so gewonnene Sediment wurde mit 40 ml EDTA-Lösung in einem Glas/Teflon-Potter unter Eiswasserkühlung ca. 30 sek. homogenisiert und über Nacht bei -40°C eingefroren.

Nach erneutem raschen Auftauen wurde das Homogenat in 20 ml EDTA-Lösung gepottert und mit der selben Lösung auf 240 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Danach 30 min. Zentrifugation bei 25.000 Upm. Das Sediment wurde in 60 ml EDTA-Lösung gepottert und unter ständigem Rühren mit 0.75 ml MgCl_2 -Lösung versetzt. Die Zugabe von 15 ml täglich frisch hergestellter NaJ-Lösung erfolgte tropfenweise innerhalb einer Minute. Nach exakt 5-min. Rühren wurde mit EDTA-Lösung auf 200 ml Gesamtvolumen aufgefüllt, bei 25.000 Upm abzentrifugiert und das Sediment in 60 ml EDTA-Lösung gepottert. Dieser Waschvorgang wurde noch mindestens vier mal wiederholt. Für die Bindungsexperimente wurde das Sediment abschließend in 60 ml EDTA-Lösung homogenisiert. Die Zellmembranen wurden bis zur Verwendung im Kühlschrank bei +4°C aufbewahrt. Die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität wurde im optisch-enzymatisch gekoppelten Test (2.4) mit 0.1 - 0.3 U/mg Protein bei 37°C bestimmt. In der Regel wurden 85-95% der Gesamt-ATPase Aktivität durch $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ g-Strophanthin gehemmt.

2.3.2 PRÄPARATION VERSCHIEDENER HOMOGENATE

Am Herzmuskel wurden linke und rechte Vorhöfe bzw. linke und rechte Ventrikel isoliert untersucht. Die Versuche an der Skelettmuskulatur wurden am M. soleus durchgeführt. In beiden Fällen wurde das Muskelgewebe freipräpariert, mit Filterpapier sorgfältig abgetrocknet und das Feuchtgewicht auf einer Analysenwaage (Sartorius, Typ 2494) bestimmt. Danach wurden die Homogenate hergestellt. Eiswasserkühlung bzw. vorgekühlte Lösungen und Mixer ermöglichten eine Durchführung aller Präparationsschritte bei 0 - 4° C.

2.3.2.1 HERZMUSKEL

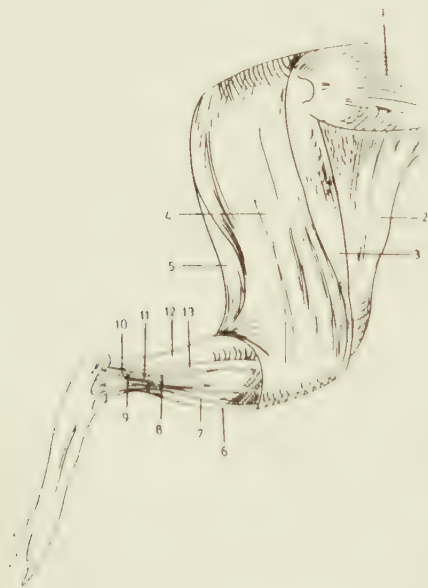
Für ein Experiment wurden die Herzen von vier Meerschweinchen frisch entnommen und die Vorhöfe und Ventrikel sorgfältig auseinanderpräpariert. Die vier linken Vorhöfe wurden mit einer Schere zerkleinert und zusammen in 6 ml Saccharose-EDTA-Lösung intensiv gepottert; bei den vier rechten Vorhöfen wurde ebenso verfahren. Die Ventrikel wurden ebenfalls zerkleinert, aber einzeln in je 6 ml obiger Lösung homogenisiert. Ab jetzt wurden Ventrikel und Vorhöfe identisch weiterverarbeitet. Das Homogenat wurde jeweils auf 60 ml mit Saccharose-EDTA-Lösung aufgefüllt und 30 Min. bei 25.000 Upm zentrifugiert. Das Sediment wurde in exakt 6 ml Saccharose-EDTA-Lösung suspendiert, intensiv bei Höchstgeschwindigkeit gepottert und sofort für Bindungsstudien verwendet.

2.3.2.2 SKELETTMUSKEL

Der *M. soleus* dient häufig als Untersuchungsmodell der Skelettmuskulatur (54, 56), weil seine Bindungskapazität für ^3H -g-Strophanthin größer ist, als die vergleichbarer Muskeln (32, 232).

Präparieranleitung:

Zuerst wurde der *M. biceps femoris*, der stärkste Beugemuskel des Unterschenkels, von seinem Ansatz am lateralen Condylus des Femur abgetrennt und nach oben geklappt. Der *M. gastrocnemius*, der den Hauptteil der Wadenmuskulatur liefert, wurde an seinem lateralen Kopf zur Seite gedrängt. Der bedeutend schwächere *M. soleus*, der auf der plantaren Fläche des Unterschenkels liegt, wurde am capitulum fibulae abgetrennt und freipräpariert.



1. *M. gluteus medius*
2. *M. tensor fasciae latae*
3. *M. vastus lateralis*
4. *M. biceps femoris*
5. *M. semitendinosus*
6. *M. tibialis anterior*
7. *M. extensor digitalis com.*
8. *M. flexor digitalis prof.*
9. *M. extensor digitalis lat.*
10. *M. peroneus brevis*
11. *M. peroneus longus*
12. *M. gastrocnemius*
13. ***M. SOLEUS***

Abb. 5: Meerschweinchen: Muskeln an der lateralen Seite der hinteren Extremität (236)

Nach Bestimmung des Feuchtgewichts wurden pro Experiment zwei Mm. solei (Hinterhand) eines Versuchstieres zuerst mit der Schere, dann mit einem Torraxgerät zerkleinert. Danach wurden sie nach der für Herzmuskelhomogenat angegebenen Methode (2.3.2.1) präpariert. Das erhaltene Sediment wurde auf 12 ml mit Saccharose-EDTA-Lösung aufgefüllt, um die Viskosität des Homogenats zu senken und somit ein exakteres Pipettieren zu ermöglichen.

2.3.3 ISOLIERUNG VON ERYTHROZYTEN

Die Tiere wurden durch Genickschlag getötet, ihr Blut in einem Becherglas aufgefangen und mit etwa 500 IE Heparin-Na (Liquemin^R) versetzt. Für eine Versuchsdurchführung sind etwa 8 ml Blut erforderlich. Das Blut wurde mit Pufferlösung auf 10 ml aufgefüllt, gut durchmischt und 20 min. bei 1000xg (Labofuge II) abzentrifugiert.

Pufferlösung: 10 mM Tris/HCl pH 7.4
10 mM Glucose
150 mM NaCl

Serum, Thrombozyten und der "white buffy coat" wurden mit der Pasteurpipette abgesaugt, die Erythrozyten in etwa 10 ml gepufferter Lösung suspendiert und auf diese Weise noch zweimal gewaschen. Das letzte Sediment wurde in der Pufferlösung 1:10 verdünnt, so daß die Endkonzentration der Erythrozyten etwa 10^9 /ml betrug. Die Zellzahl wurde mit Hilfe eines Clinicon-Counter Hämatologie Zählgerätes nach Herstellung der Stamm- und Verdünnungslösungen zweifach geprüft.

2.4 BESTIMMUNG DER $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-AKTIVITÄT

Die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase katalysiert folgende Reaktion:

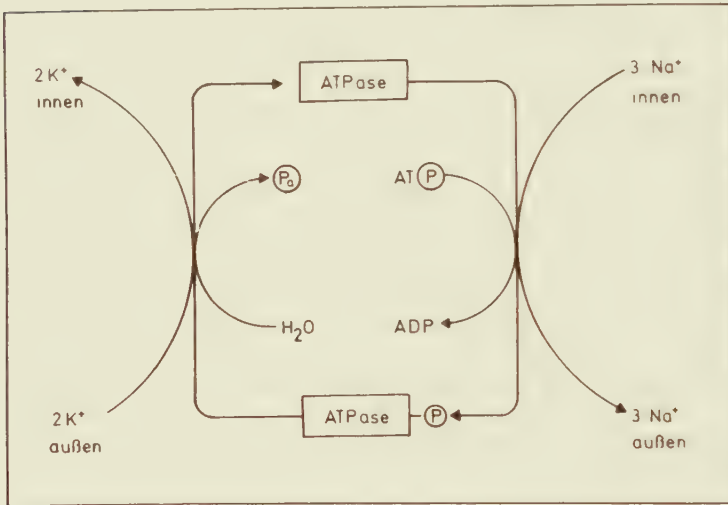


Abb. 6: Mechanismus der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase (138)

Zu ihrer Aktivierung sind notwendig: K^+ oder NH_4^+ , Na^+ , Mg^{2+} .

2.4.1 PRINZIP DES OPTISCH-KINETISCHEN TESTS

Schoner et al. (225) entwickelten 1967 einen Test zur Messung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -aktivierbaren ATPase, indem sie die eigentliche ATP-Spaltungsreaktion mit dem Enzymtest nach Warburg und Christian aus dem Jahre 1936 koppelten. Bei Verwendung zweier Hilfsenzyme ist es seitdem möglich, die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-

Aktivität photometrisch zu bestimmen, vorausgesetzt, die Reaktionsgeschwindigkeit wird nicht durch einen Überschuß an Reaktionsprodukten bzw. einen Substratmangel beeinträchtigt. Dies wird durch einen ATP-regenerierenden Schritt (Abb.7) gesichert, welcher die ATP-Konzentration während des Tests konstant hält. Die ATP-Hydrolyse bewirkt einen ADP-Anstieg. Dieser steht in einem stöchiometrischen Verhältnis zur zeitlichen Abnahme der NADH-Extinktion bzw. -Konzentration, welche dadurch zur entscheidenden Meßgröße wird. Diese kann direkt bei einer Wellenlänge von 334 nm photometrisch bestimmt werden.

Reaktionsablauf (Abb. 7):

1. Adenosinphosphatasen (ATPasen) spalten ATP hydrolytisch in ADP und anorganisches Phosphat.
2. Das entstehende ADP wird nach Zusatz von Phosphoenolpyruvat (PEP) durch Pyruvat-Kinase (PK) phosphoryliert, wobei Pyruvat entsteht und ATP regeneriert wird.
3. Pyruvat wird durch Lactatdehydrogenase (LDH) zu Lactat reduziert, nach Zusatz von Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid- H_2 ($NADH+H^+$)

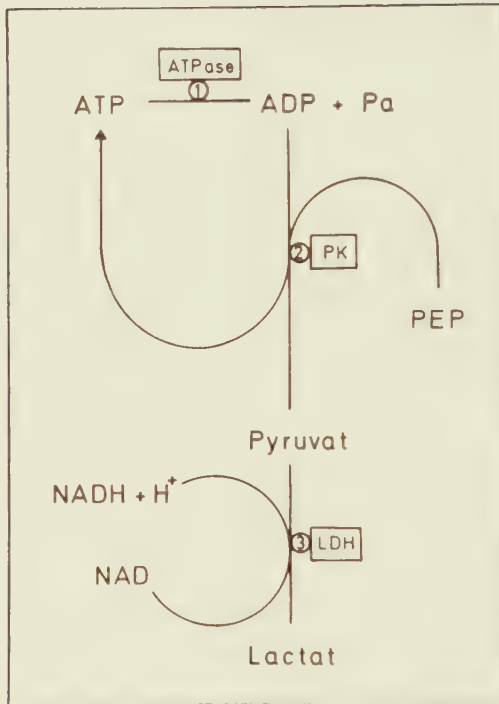


Abb. 7: Prinzip des optisch-kinetischen Tests

2.4.2 AKTIVITÄTSMESSUNG IN ZELLMEMBRANPRÄPARATIONEN

Verwendetes Material: Eppendorf-Photometer 1101 M
Eppendorf-Kompensationsschreiber 6511
Braun-Wasserheizung (37°C)
Küvetten mit einer Innenweite von 1(cm)

ATPase Testlösung:	Imidazol	66.6 mM
	NaCl	100.0 mM
	NH ₄ Cl	66.6 mM
	MgCl ₂	3.3 mM
	ATP-Na ₂	3.3 mM
	PEP	1.6 mM
	NADH+H ⁺	0.3 mM
	PK	6.0 U
	LDH	6.0 U

Der pH beträgt 7.25. NaCl und NH₄Cl sind in Magnesiumphosphatpuffer gelöst.

Die Reaktionskette wurde durch Zugabe von Zellmembran-Homogenat zur ATPase-Testlösung gestartet. Im optisch-kinetischen Test werden neben der (Na⁺+K⁺)-ATPase auch die mit Magnesium aktivierbaren ATPasen erfaßt.

Testansatz pro Küvette Nr:	I	II
Testlösung	1.50 ml	1.50 ml
Enzympräparation	0.05 ml	0.05 ml
g-Strophanthinslösung 10 ⁻³ M	-	0.10 ml
	Gesamtaktivität	unspez. Aktivität

Unspezifisch aktiv ist der Anteil der ATPase, der sich auch durch 10⁻³ M g-Strophanthinslösung nicht hemmen läßt. Da jedoch nur die (Na⁺+K⁺)-ATPase durch g-Strophanthin hemmbar ist, läßt sich deren spezifische Aktivität aus der Differenz der ATPase-Aktivitäten mit und ohne g-Strophanthin ermitteln.

$$\text{Enzymaktivität (U/ml)} = \frac{\Delta E \times V}{\epsilon \times v}$$

ΔE = Extinktionsänderung /min
 V = Gesamtvolumen (ml)
 v = zugegebene Enzymmenge (ml)
 ϵ = Extinktionskoeffizient 6.18 (cm²/μMol)

Die zugegebene Menge des Zellmembran-Homogenats wurde zwecks größerer Meßgenauigkeit so verdünnt, daß bei einem Papierschub von 2 cm/min die Extinktionsabnahme pro Minute etwa 0.2 Einheiten betrug. Das Ergebnis wird in U/ml angegeben, wobei

1 unit (= Enzymeinheit) definiert ist als die Reaktionsgeschwindigkeit, welche einen Umsatz von 1 μmol ATP pro Minute bei 37°C ermöglicht.

2.4.3 ZEITABHÄNGIGER VERLAUF DER AKTIVITÄT

Die Inkubation wurde bei 37°C im Schüttelwasserbad (Braun-Melsungen) durchgeführt.

Testlösung:	1.8 ml Imidazol/ PO_4	0.1 M
	3.0 ml Imidazol/HCl	1.0 M
	1.8 ml MgCl_2	0.1 M
	0.3 ml H-g-Strophanthin	
	2.1 ml Aqua bidest	
	9.0 ml Gesamtvolumen der Testlösung	

Inkubationsansatz	
pro Reagenzglas:	0.3 ml Testlösung
	1.6 ml Aqua bidest
	0.1 ml Zellmembran-Homogenat
	2.0 ml Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes

Zu den angegebenen Zeiten wurden aus diesem Inkubat 0.1 ml entnommen und die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität im optisch-kinetischen Test nach Schoner et al. (225) ermittelt. Durch Hemmung mit 1×10^{-3} g-Strophanthin wurde der Anteil der spezifischen $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ an der Gesamtaktivität bestimmt (2.4.2). Aus den Versuchen zur Zeitabhängigkeit der Bindung erhält man die Inkubationszeit, die bis zum Erreichen des Gleichgewichtszustandes erforderlich ist.

2.5 BESTIMMUNG DER ^3H -g-STROPHANTHINBINDUNG AN REZEPTOREN

2.5.1 FILTERVERFAHREN UND PROBENAUFBEREITUNG

Tritiummarkiertes ^3H -g-Strophanthin ist besonders gut wasserlöslich und besitzt eine hohe Affinität für Herzglykosid-rezeptoren. Deshalb wurde für die Bindungsstudien von Herzgly-

kosiden an isolierten Zellmembranen dieser Ligand verwendet. In Polypropylen-Zentrifugen-Röhrchen (Fa.Christ, Osterode/Harz), die selbst keine ^3H -g-Herzglykoside binden, wurde das Gesamtreaktionsvolumen von jeweils 2 ml pro Ansatz inkubiert. Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 0.1 - 0.2 ml Zellmembran-Homogenat zu den vorpipettierten Lösungen. Aus den Versuchen zur Zeitabhängigkeit der Bindung wurde die Inkubationszeit bestimmt, die zum Erreichen des Gleichgewichtszustandes erforderlich ist. Nach Ablauf der entsprechenden Inkubationszeit wurde die Reaktion mit 10 ml eiskaltem destilliertem Wasser gestoppt. Da der Herzglykosidrezeptor membran-gebunden ist, kann man das an den Herzglykosidrezeptor auf den Membranen gebundene ^3H -g-Strophanthin durch Abfiltrieren des nicht membrangebundenen ^3H -g-Strophanthins isolieren. Zum raschen Filtrieren wurden Mikroglassfilter (Whatman GF/C) mit einem Durchmesser von 2.5 cm und eine Nutsche (mit Saugflasche und Wasserstrahlpumpe) verwendet. Die Vakuumfilterbank wurde nach jeder Filtration mit Aqua bidest (10 ml, gekühlt auf Eistemperatur) nachgespült, um auch die Flüssigkeitsreste zu erfassen. Die nunmehr radioaktiven Glasfaserfilter wurden auf Glasplatten gesammelt und anschließend in einem Trockenschrank bei 90°C 30 min. getrocknet. Mit einer Pinzette wurden die Filter danach in die Zählröhrchen gelegt und nach Zugabe von 10 ml Szintillationsflüssigkeit (Quickszint 501, Fa. Zinser Analytic) 5 min. im Tritiumkanal ausgezählt. Als Szintillationszählgeräte standen zur Verfügung: Packard Tri-carb 2660 und Betaszint BF 5000 (Fa. Berthold). Die Radioaktivität wurde in cpm gemessen.

2.5.2 DEFINITION DER UNSPEZIFISCHEN BINDUNG

Wenn unmarkiertes Strophanthin in einer wesentlich höheren Konzentration als radioaktiv gekennzeichnetes Strophanthin den Membranen angeboten wird, so werden fast alle Glykosidrezeptoren mit unmarkiertem Strophanthin abgesättigt (Kompetitive Bindung). Trotzdem gebundene Radioaktivität wird als unspezifische definiert. Ursache dafür kann z.B. ein Haftenbleiben von ^3H -g-Strophanthin am Mikroglassfaserfilter sein.

- Assoziation und konzentrationsabhängige Bindung:

Unspezifisch gebunden ist der Anteil an ^3H -g-Strophanthin, der trotz Gegenwart von 1×10^{-3} M unmarkiertem g-Strophanthin an Membranen bindet.

- Dissoziation: Der Anteil an gebundenem ^3H -g-Strophanthin, der trotz Anwesenheit von 1×10^{-3} M unmarkiertem g-Strophanthin nicht abdissoziiert, ist unspezifisch gebunden.

Im Filterverfahren betrug die unspezifische Bindung regelmäßig weniger als 1% der gemessenen Maximalaktivitätsmenge (2.5.4).

2.5.3 DEFINITION DER SPEZIFISCHEN BINDUNG

Für die quantitative Auswertung wurde die Differenz von gebundener Gesamtradioaktivität und dem Anteil an unspezifisch gebundenen Liganden herangezogen. Diese ist als spezifische Bindung definiert.

2.5.4 BESTIMMUNG DES MAXIMAL VORHANDENEN

³H-g-STROPHANTHINS

Von der ³H-g-Strophanthin Stammlösung wurde ein Aliquot von 0.01 ml auf einen Rundfilter pipettiert. Nach einer Trocknungszeit von 30 min. bei 90°C wurde der Filter mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit Quickszint 501 übergossen und im Tritiumkanal des Szintillationszählgerätes 5 min. gemessen. Dieser Maximalwert (ca. 60.000-90.000 cpm) wurde jeweils in Fünffachbestimmung angesetzt und das Ergebnis gemittelt.

2.6 ANSÄTZE DER BINDUNGSSTUDIEN

2.6.1 ASSOZIATION: ZEITABHÄNGIGE BINDUNG

Das Membranprotein wurde in speziellen Zentrifugenröhrchen mit 50 mM Imidazol/HCl, 3 mM Imidazol/PO₄, 3 mM Magnesiumchlorid, ³H-g-Strophanthin und Aqua bidest inkubiert.

Beispiel: 0.10 ml Imidazol/HCl	1 M	pH 7.25
0.06 ml Imidazol/PO ₄	0.1 M	pH 7.25
0.06 ml MgCl ₂	0.1 M	
0.01 ml ³ H-g-Strophanthin	4.1x10 ⁻⁹ M	
0.10 ml Enzympräparation		
1.67 ml Aqua bidest		

2.00 ml Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes

Die Inkubation erfolgte im Schüttelwasserbad bei den angegebenen Temperaturen. Technische Durchführung (2.5.1)

2.6.2 DISSOZIATIONSKONSTANTE: KONZENTRATIONSSABHÄNGIGE BINDUNG

Das Inkubationsmedium, bestehend aus 50 mM Imidazol/HCl, 3 mM Imidazol/PO₄, 3 mM MgCl₂ und ³H-g-Strophanthin wurde mit Zellmembran/Homogenat versetzt. Die Reaktionsansätze enthiel-

ten zusätzlich steigende Konzentrationen (10^{-7} M bis 10^{-5} M)
nicht radioaktiv markierten g-Strophanthins.

Beispiel: 0.10 ml	Imidazol/HCl	1	M	pH	7.25
0.06 ml	Imidazol/ PO_4	0.1	M	pH	7.25
0.06 ml	MgCl_2	0.1	M		
0.01 ml	$^3\text{H-g-Strophanthin}$	4.1×10^{-9}	M		
0.10 ml	Enzympräparation				
1.47 ml	Aqua bidest				
0.20 ml	g-Strophanthin	10^{-7}	10^{-5}	M	
2.00 ml	Gesamt volumen des Reaktionsansatzes				

Die Inkubationszeit wurde aus den Versuchen zur zeitabhängigen Bindung von $^3\text{H-g-Strophanthin}$ an die Zellmembranen ermittelt. Sie entspricht der Zeit, die dort bis zur Gleichgewichtseinstellung erforderlich war. Die Inkubation erfolgte im Schüttelwasserbad bei den angegebenen Temperaturen. Technische Durchführung (2.5.1)

2.6.3 DISSOZIIATION: ZEITABHÄNGIGE BINDUNGSABNAHME

2.6.3.1 PRÄPARATION DES $^3\text{H-g-STROPHANTHIN-REZEPTOR-KOMPLEXES}$

In einem Erlenmeyerkolben (Schüttelwasserbad) wurden Zellmembranen mit 50 mM Imidazol/HCl, 3 mM Imidazol/ PO_4 , 3 mM Magnesiumchlorid, $^3\text{H-g-Strophanthin}$ und Aqua bidest bei den angegebenen Temperaturen inkubiert.

Beispiel: 0.30 ml	Imidazol/HCl	1	M	pH	7.25
0.18 ml	Imidazol/ PO_4	0.1	M	pH	7.25
0.18 ml	MgCl_2	0.1	M		
0.10 ml	$^3\text{H-g-Strophanthin}$	4.1×10^{-9}	M		
3.50 ml	Enzympräparation				
1.74 ml	Aqua bidest				

6.00 ml Gesamt volumen des Reaktionsansatzes

Die erforderliche Inkubationszeit (120 min.) bis zum Erreichen des Bindungsäquilibrium wurde aus den Versuchen zur Zeitab-

hängigkeit der Bindung bestimmt. Der nach dieser Methode erhaltene ^3H -Herzglykosid-Rezeptor-Komplex wurde 30 min bei 30.000 Upm abzentrifugiert (Beckmann L 5-50, Rotor 60 Ti, 0°C). Der Überstand mit dem nicht gebundenen ^3H -g-Strophanthin wurde verworfen, das Sediment in einem Glas/Teflon-Potter (Braun-Melsungen, Eiswasserkühlung) mit 6 ml Aqua bidest homogenisiert. Alle verwendeten Materialien waren hierbei vorgekühlt. Das Homogenat bestand somit ausschließlich aus membrangebundenem ^3H -g-Strophanthin.

2.6.3.2 MESSUNG DER DISSOZIATION DES ^3H -g-STROPHANTHIN-REZEPTOR-KOMPLEXES

Nach erfolgter Isolierung des ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes (2.6.3.1) wurde davon Membranprotein in Polypropylen Zentrifugenröhrchen bei den angegebenen Temperaturen mit 50 mM Imidazol/HCl, 3 mM Imidazol/ PO_4 , 3 mM Magnesiumchlorid, 10^{-3}M unmarkiertem g-Strophanthin und Aqua bidest inkubiert.

Beispiel: 3.0 ml Imidazol/HCl	1 M	pH 7.25
1.8 ml Imidazol/ PO_4	0.1 M	pH 7.25
1.8 ml MgCl_2	0.1 M	
2.4 ml Aqua bidest		

9.0 ml Gesamtansatzlösung

Von dieser Ansatzlösung wurden 0.3 ml in jedes Zentrifugenröhrchen pipettiert.

Beispiel: 0.3 ml Ansatzlösung
0.2 ml g-Strophanthin 10^{-3}M
0.2 ml ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Komplex
1.3 ml Aqua bidest

2.0 ml Gesamtvolumen eines Reaktionsansatzes

Die Verdrängung des ^3H -g-Strophanthins von seinem Membranrezeptor durch das unmarkierte g-Strophanthin wurde nach unterschiedlich langer Inkubationsdauer durch rasches Abfiltrie-

ren mit 0°C kaltem Wasser gestoppt. Das Reaktionsgemisch wurde, wie unter 2.5.1 beschrieben, abfiltriert, und die noch membrangebundene Menge des ^3H -g-Strophanthin-Rezeptorkomplexes durch Radioaktivitätsmessung der Filter ermittelt. Zur Bestimmung des im Inkubationsmedium maximal gebundenen ^3H -g-Strophanthins wurde eine aliquote Menge des ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes zum Reaktionsansatz zugegeben und ohne Inkubation sofort abfiltriert (2.5.4). Die unspezifische Bindung von ^3H -g-Strophanthin an Zellmembranen wurde in Gegenwart von 1×10^{-3} M unmarkiertem g-Strophanthin bestimmt (2.5.2). Das nach einer Inkubationszeit von 5 Stunden nicht abdissoziierbare ^3H -g-Strophanthin wurde als unspezifisch gebunden definiert.

2.7 PHARMAKODYNAMISCHE UNTERSUCHUNGEN AN ELEKTRISCH STIMULIERT SCHLAGENDEN HERZ- UND SKELETTMUSKELN

2.7.1 PRÄPARATION DER VORHÖFE, PAPILLAR- UND SKELETTMUSKELN

Gleichaltrige Meerschweinchen (2.2) wurden durch Genickschlag getötet, die Herzen rasch entnommen und sorgfältig von Gefäßresten und anhängendem Bindegewebe befreit. Unter einer Präparierlupe wurden die Vorhöfe in einer kontinuierlich mit Carbogen (95% Sauerstoff, 5% Kohlendioxid) äquilibrierten Krebs-Henseleit-Lösung bei Zimmertemperatur sorgfältig freipräpariert. Ebenso wurde mit den Papillarmuskeln verfahren, die ganz besonders druckempfindlich sind. Zur schonenden Präparation der Papillarmuskeln wurden die Ventrikel entlang des Septum interventrikuläre eröffnet. Die Präparation des M. soleus erfolgte wie in 2.3.2.2 beschrieben (41).

2.7.2 NÄHRLÖSUNGEN FÜR DIE KONTRAKTIONSVERSUCHE

Die Badlösungen wurden ständig mit O_2 (95%) und CO_2 begast, der pH war 7.4 und die Temperatur $32^\circ C$. Zur Bestimmung des zeitabhängigen Verlaufs der g-Strophanthinwirkung auf die Kontraktionskraft wurde Krebs-Henseleit-Lösung verwendet (Abb. 34, 35, 41):

Krebs-Henseleit-Lösung:	NaCl	118.0 mmol/l
	KCl	4.7 mmol/l
	$MgSO_4 \times 7 H_2O$	1.2 mmol/l
	KH_2PO_4	1.2 mmol/l
	$NaHCO_3$	25.0 mmol/l
	$CaCl_2 \times 6 H_2O$	2.5 mmol/l
	Glucose	10.0 mmol/l

Tyrode-Lösung diente bei den Versuchen zur Erstellung der Konzentrationswirkungskurven als Nährlösung (Abb. 32, 33):

Tyrode-Lösung:	Na^+	149.3 mmol/l
	K^+	5.4 mmol/l
	Ca^{++}	1.8 mmol/l
	Mg^{++}	1.05 mmol/l
	Cl^-	148.0 mmol/l
	HCO_3^-	11.9 mmol/l
	$H_2PO_4^-$	0.43 mmol/l
	Glucose	10.0 mmol/l

2.7.3 MESSUNG DER KONTRAKTIONSKRAFT VON HERZ- UND SKELETT-MUSKELN BEI ELEKTRISCHER STIMULATION

Die Vorhöfe wurden, wie unter 2.7.1 beschrieben, unter einer Lupe in der Nährlösung präpariert und mit einem Häkchen zwischen Platin-Reizelektroden an einem Kunststoffstab befestigt. Das noch freie Ende des Vorhofs wurde mit einem Faden an einem induktiven Kraftaufnehmer (BB Transducer FU 10 DC) fixiert, der zur Messung der Kontraktionskraft diente (Abb. 8).

Die so aufgespannten Vorhöfe (Vorspannung 10mN) konnten in die Organbäder aus Glas eingetaucht werden, in denen sich 75 ml der Carbogen-begasten Inkubationslösung befanden (Abb. 9).

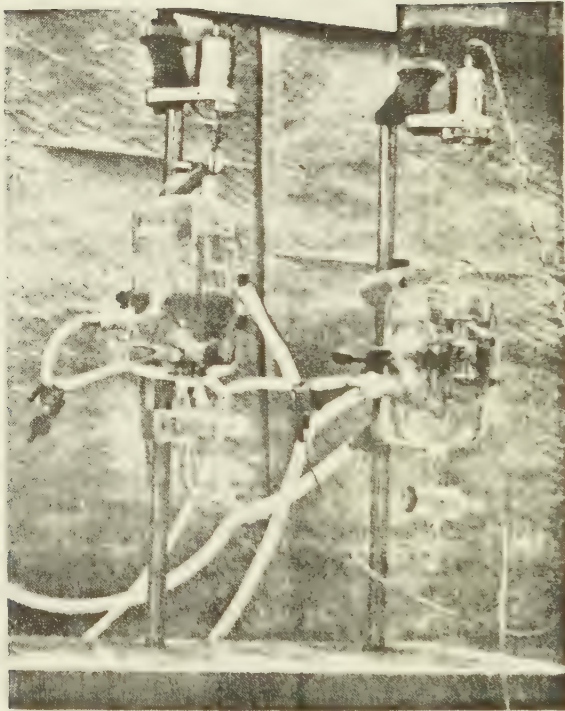


Abb. 8

Versuchsaufbau zur Elektrostimulation und Kontraktionskraft-
messung von Herzmuskeln

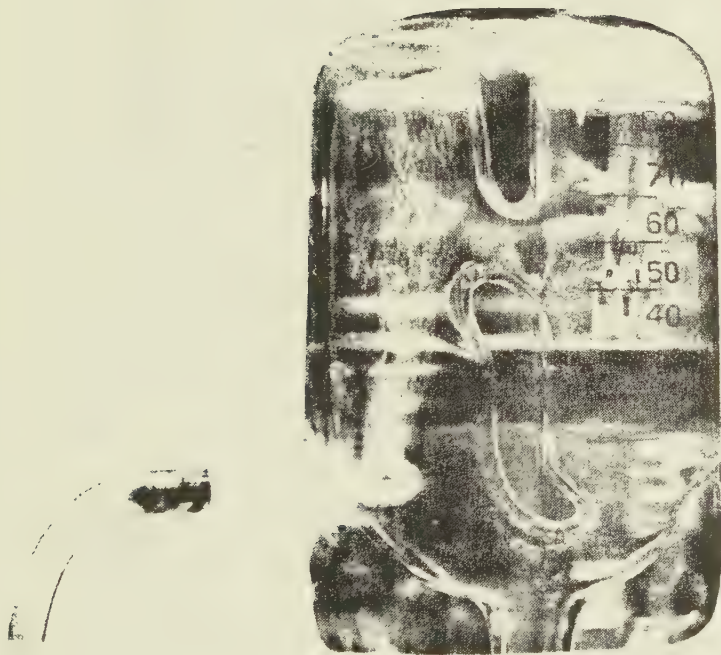


Abb. 9

Elektrische Vorhofstimulation in einem Carbogen begasten Organbad

Die vom Vorhof entwickelte Spannung wurde isometrisch mit dem induktiven Kraftaufnehmer gemessen, elektrisch verstärkt und auf einem Hellige 8-Kanalschreiber registriert (Abb.10). Zur elektrischen Stimulation der Vorhöfe und Papillarmuskeln wurden Rechtecksimpulse verwendet (Frequenz 1 Hertz, Reizdauer 5 msec, Reizstromstärke 10-20% überschwellig). Als Reizgerät diente ein Grass S 88 Stimulator (Abb.11). Die maximal erreichbare Ausgangskraft wurde durch sukzessive Erhöhung der Reizstromstärke und durch Korrektur der Vorlast ermittelt und während des Versuchs konstant gehalten. An der Spitze der Spannungskurve konnte die maximale Spannungsentwicklung isometrisch bestimmt werden (183). Vor dem eigentlichen Versuch wurden die Organe etwa 60 min. lang äquilibriert, wobei alle 20 min, die entsprechende Nährlösung erneuert wurde. Nach Erreichen des Äquilibriums wurde die jeweils zu testende g-Strophanthin-Konzentration zugegeben. Bei den Konzentrationswirkungskurven wurden die erforderlichen Herzglykosidkonzentrationen durch kumulative Zugabe hergestellt; bei allen übrigen Kontraktionsversuchen wurde lediglich ein Organ für eine Herzglykosidkonzentration verwendet und der Kurvenverlauf mindestens eine halbe Stunde aufgezeichnet. Ein Experiment wurde für jede Konzentration 6-9 mal durchgeführt. Beim Papillarmuskel erfolgte die Messung der Kontraktionskraft mit dem Gould 2400-Schreiber (Abb.11). Zum Fixieren und Aufspannen wurde hierbei feinstes atraumatisches Nahtmaterial verwendet. Die Mm. solei wurden in Muskelstreifen von ca. 1 - 1.5 mm Dicke und 10 - 30 mm Länge zerteilt (Details: 41). Im weiteren Verlauf war die Methodik der Kontraktionsversuche an Herz- und Skelettmuskeln identisch.

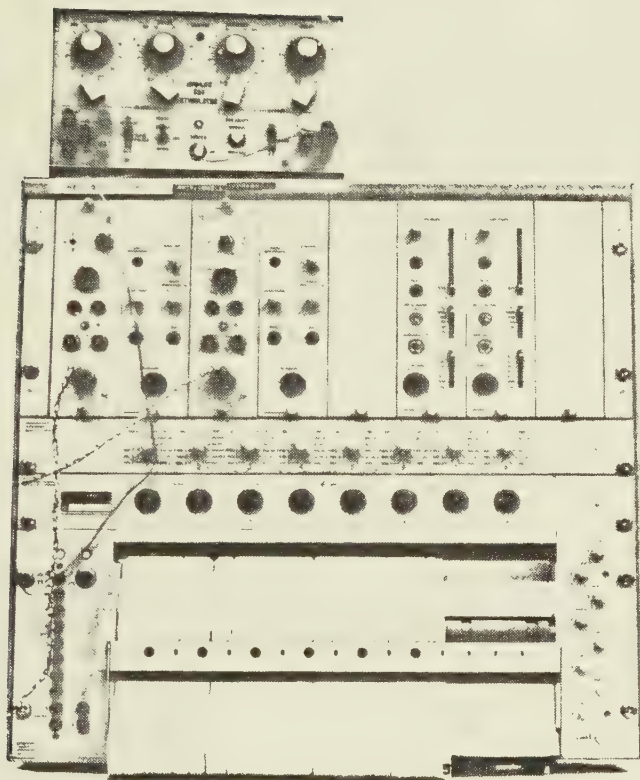


Abb. 10

Reizstromgerät und 8-Kanalschreiber für Untersuchungen
an Vorhöfen

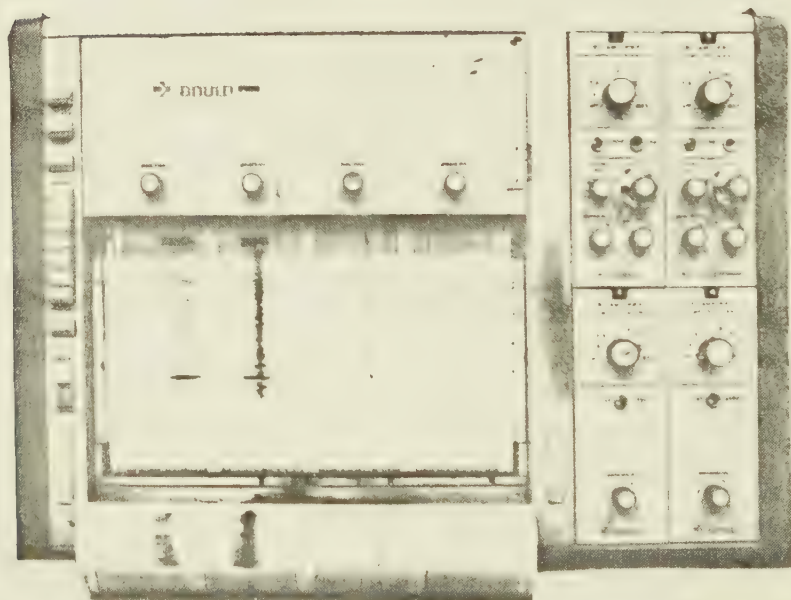
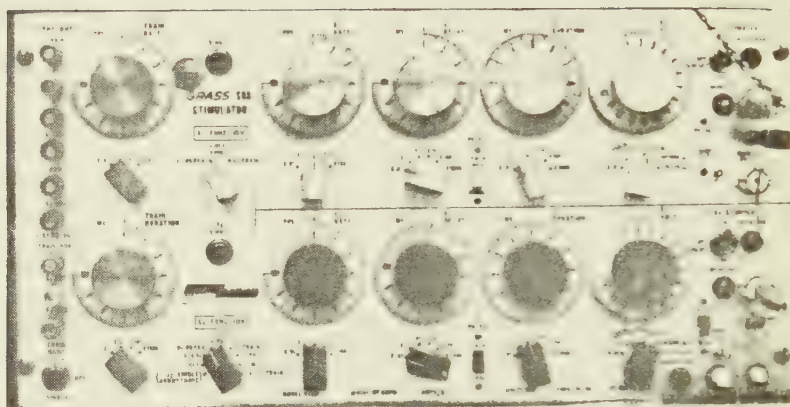


Abb. 11

Reizstrom- und Registriergerät für Messungen an Papillarmuskeln

3. ERGEBNISSE

3.1 CHARAKTERISIERUNG DES REZEPTORS

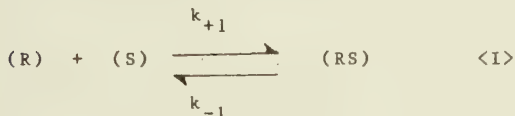
Viele biologische Vorgänge in einem Organismus lassen sich auf das Zusammenspiel von Wirkstoffen mit spezifischen Rezeptoren zurückführen (19, 59, 140, 141, 151, 165, 168, 169, 187, 198, 203).

Schon zu Beginn unseres Jahrhunderts hatte der Nobelpreisträger Paul Ehrlich den Satz geprägt: Corpora non agunt, nisi fixata (79). Solche Bindungsstellen lassen sich in der Rezeptorbiochemie mit Hilfe radioaktiv markierter Pharmaka feststellen. Auch für Herzglykoside konnte so ein Rezeptor nachgewiesen und charakterisiert werden (4, 89, 227, 230).

3.1.1 SPEZIFISCHE UND UNSPEZIFISCHE BINDUNG VON

³H-g-STROPHANTHIN AN ISOLIERTE ZELLMEMBRANEN

Mit dem Massenwirkungsgesetz läßt sich die reversible Bindung von g-Strophanthin an den Herzglykosidrezeptor beschreiben (17, 82, 124, 228):



R = Herzglykosidrezeptor

S = g-Strophanthin

RS = g-Strophanthin-Rezeptorkomplex

Gilt diese Gleichung, ist die Wirkstärke des Pharmakons direkt proportional der Anzahl der von ihm besetzten Rezeptoren (53).

Für den Gleichgewichtszustand gilt dann:

$$\frac{(R) \times (S)}{(RS)} = K_D = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} \quad (M) \quad <II>$$

(R) = molare Rezeptorkonzentration

(S) = molare g-Strophanthinkonzentration

(RS) = molare Konzentration des g-Strophanthin-Rezeptorkomplexes

K_D = Dissoziationskonstante des g-Strophanthin-Komplexes

k_{+1} = Assoziationsgeschwindigkeitskonstante

k_{-1} = Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante

Die Bedeutung quantitativer Messungen der Rezeptoren und ihrer Liganden in Bindungsexperimenten ist damit verständlich.

Inkubiert man Zellmembranhomogenate und ^3H -g-Strophanthin in geeigneten Pufferlösungen, stellt sich mit zunehmender Inkubationsdauer ein Äquilibrium ein, weil pro Zeiteinheit genauso- viel g-Strophanthin-Rezeptor-Komplex zerfällt, wie neugebildet wird. 1:500 000 ist die statistische Wahrscheinlichkeit, daß ein radioaktiv markiertes Glykosid an einen Rezeptor bindet, wenn man die Zellmembranen nicht nur mit ^3H -g-Strophanthin inkubiert, sondern dem Rezeptor zusätzlich große Mengen (1×10^{-3} Endkonzentration) unmarkiertes g-Strophanthin anbietet (200).

Praktisch alle Glykosidrezeptoren sind unter diesen Bedingungen mit nicht markiertem g-Strophanthin abgesättigt. Wird trotzdem noch Radioaktivität an den Membranen gemessen, nennt man die Bindung unspezifisch. Sie beträgt bis zu 5% der Gesamtbindung und wird von dieser subtrahiert. Auf diese Weise erhält man die spezifische Bindung von ^3H -g-Strophanthin an Herzglykosidrezeptoren der Zellmembranen (85).

3.1.2 ZEITABHÄNGIGE BINDUNG VON ^3H -g-STROPHANTHIN AN HERZMUSKELZELLMEMBRANEN

Die Bindung von ^3H -g-Strophanthin an Membranpräparationen von Herzmuskelzellen zeigt einen zeitabhängigen Verlauf (Abb.12). Der Kurvenverlauf entspricht der erwarteten Sättigungskinetik. Der membrangebundene ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Komplex erreichte nach 5 min. den Gleichgewichtszustand und blieb bei 37°C über mehrere Stunden stabil. Für die Bindungsstudien an Herzmuskelzellmembranen betrugen die Inkubationszeiten 60 - 120 min. Der Einfluß von Kalium auf die Bindung von g-Strophanthin an den Rezeptor zeigt sich in einer Änderung des zeitabhängigen Verlaufs. Nach Zugabe einer 2mM KCl-Lösung zur Zellmembranpräparation verlängert sich die Zeit bis zum Erreichen des Gleichgewichtszustandes. Das Äquilibrium stellt sich erst nach 10 min. ein. Außerdem ist die Menge an rezeptorgebundenem g-Strophanthin in Gegenwart von Kaliumionen deutlich verringert (Abb.12,27)

3.1.3 TEMPERATURABHÄNGIGKEIT DER ASSOZIATIONS- GESCHWINDIGKEITSKONSTANTE k_{+1}

Die Bildung des g-Strophanthin-Rezeptorkomplexes ist zeit- und temperaturabhängig (Tab.2) und folgt einer bimolekularen Reaktionskinetik. Bei Kenntnis der Anfangskonzentration des freien Glykosidrezeptors lassen sich die Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{+1} berechnen (82, 85), indem man die Menge des ^3H -g-Strophanthin-Rezeptorkomplexes experimentell bestimmt und die einzelnen Meßwerte in die Gleichung für eine Reaktionskinetik 2. Ordnung einsetzt:

$$k_{+1} = \frac{2.303}{(a-b) \cdot t} \times \log \frac{b(a-x)}{a(b-x)} (M^{-1} \text{sec}^{-1}) \quad \text{<III>}$$

a = g-Strophanthin-Anfangskonzentration

b = Anfangskonzentration des freien Rezeptors

x = Menge des g-Strophanthin-Rezeptorkomplexes zur Zeit t

Die Bindungskinetik in Abb. 13 zeigt eine lineare Beziehung und entspricht somit einer bimolekularen Reaktion.

Aus dem Anstieg der Geraden kann man die einzelnen Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten für die verschiedenen Inkubationstemperaturen ermitteln (Tab. 2).

Die Assoziationsgeschwindigkeit k_{+1} nimmt mit steigender Inkubationstemperatur zu.

Tab. 2: Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{+1} an Herzmuskelzellmembranen in Abhängigkeit von der Temperatur

Spezies-Organ	Meerschweinchen-Herz			
Temperatur °C	10	20	30	37
Temperatur K	283	293	303	310
$k_{+1} (M^{-1} \text{sec}^{-1})$	0.74×10^4	2.37×10^4	3.78×10^4	5.28×10^4

3.1.4 TEMPERATURABHÄNGIGKEIT DER DISSOZIATIONS- GESCHWINDIGKEITSKONSTANTEN k_{-1}

Inkubiert man ^3H -g-Strophanthin-Rezeptorkomplexe über längere Zeit, so kommt es zu einem Abdissoziieren von ^3H -g-Strophanthin-molekülen vom Rezeptor; d. h., die Bindung ist reversibel. Bei halblogarithmischer Auftragung der Meßwerte in % (Abb. 14) zeigt sich eine lineare Beziehung; d. h., die Dissoziation ist ein monomolekularer Prozeß und folgt einer Reaktionskinetik 1. Ordnung.

Die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1} ist zeit- und temperaturabhängig (Tab. 3) und errechnet sich aus:

$$k_{-1} = \frac{0.693}{t_{1/2}} \quad (\text{sec}^{-1}) \quad <\text{IV}>$$

$t_{1/2}$ = Zeit, in der ein ^3H -g-Strophanthin-Rezeptorkomplex zur Hälfte zerfallen ist

Tab. 3: Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1} an Herzmuskelzellmembranen in Abhängigkeit von der Temperatur.

Spezies-Organ	Meerschweinchen-Herz				
Temperatur $^{\circ}\text{C}$	10	20	30	37	
Temperatur K	283	293	303	310	
$k_{-1}(\text{sec}^{-1}) \times 10^{-3}$	0.30	0.07	1.31	0.09	3.82
					9.39

Die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1} nimmt mit steigender Inkubationstemperatur zu.

3.1.5 BESTIMMUNG DER TEMPERATURABHÄNGIGEN DISSOZIATIONS-KONSTANTEN K_D MIT DREI VERSCHIEDENEN METHODEN

Die Dissoziationskonstante K_D ist ein Maß für die Affinität zwischen ^3H -g-Strophanthin und dem Herzglykosidrezeptor. Je kleiner die Dissoziationskonstante, desto größer ist die Affinität (3.1.1). Unter Äquilibriumbedingung gibt sie diejenige g-Strophanthin-Konzentration an, bei der 50% der Herzglykosidrezeptoren besetzt sind.

Die Dissoziationskonstante K_D läßt sich verschiedenartig ermitteln.

I. Direkte Methode

Unter Gleichgewichtsbedingungen wird eine konzentrationsabhängige Bindung von g-Strophanthin an Membranpräparationen durchgeführt. Entscheidend ist hier das Verhältnis von freiem zu gebundenem ^3H -g-Strophanthin. Da die Anzahl der Rezeptor-

ren begrenzt ist, folgt die Bindungskurve einer Sättigungskinetik und erreicht ein Plateau (Abb.24). Die Asymptote an diese Sättigungskurve schneidet die Ordinate und ergibt so näherungsweise die Bindungskapazität der Membranen für g-Strophanthin. Es ist oft schwierig, die Asymptote an einer Hyperbel exakt zu bestimmen. Eleganter und aussagekräftiger ist es deshalb, die Bindungsdaten nach Scatchard (220) aufzutragen. Hierbei kann man durch die Meßpunkte eine Gerade ziehen und aus deren Steigung die Dissoziationskonstante errechnen (Abb.15). Der Schnittpunkt dieser Geraden mit der Ordinate ergibt die extrapolierte Bindungskapazität; d. h., die maximale Anzahl der Bindungsstellen für g-Strophanthin. Außerdem weist eine Gerade in der Auftragung nach Scatchard auf einen einheitlichen Rezeptortyp hin, da die Dissoziationskonstanten bei den verschiedenen g-Strophanthinkonzentrationen gleich bleiben.

II. Indirekte Methode

Die Konkurrenz von ^3H -g-Strophanthin und nicht markiertem Strophanthin um die gleiche Bindungsstelle am Glykosidrezeptor ermöglicht eine indirekte Bestimmung der Dissoziationskonstanten. Diese sog. Verdrängungsmethode nach Erdmann und Schoner (84) erlaubt alternativ zum direkten Verfahren nach Scatchard eine Berechnung der Dissoziationskonstanten. Unter der Voraussetzung, daß beide Substanzen unter Gleichgewichtsbedingungen um den selben Rezeptor konkurrieren, gilt folgende Formel:

$$K_D = \frac{(R_t) - B_x - (RX) \quad x \quad (x_t) - (RX)}{(RX)} \quad \langle V \rangle$$

R_t = Gesamtkonzentration des Rezeptors
 x_t = Gesamtkonzentration des unmarkierten g-Strophanthins
 B_x = H-g-Strophanthin-Rezeptorkomplex in Gegenwart von unmarkiertem g-Strophanthin
 RX = g-Strophanthinrezeptorkomplex

III. Methode

Aus dem Quotienten der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{-1} und der Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{+1} lässt sich ebenfalls die Dissoziationskonstante K_D berechnen:

$$K_D = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} \quad (M) \quad \langle VI \rangle$$

Nach den Methoden I-III wurden jeweils die Dissoziationskonstanten K_D in Abhängigkeit von der Temperatur ermittelt.

Tab. 4: Bestimmung der temperaturabhängigen Dissoziationskonstante K_D an Herzmuskelzellmembranen nach drei verschiedenen Methoden.

Spezies-Organ	Meerschweinchen-Herz			
Temperatur °C	10	20	30	37
Temperatur K	283	293	303	310
I. Direkte Best. $K_D (M) \times 10$	0.53 $\pm$ 0.14	0.68 $\pm$ 0.04	0.88	1.13
II. Indirekte Best. $K_D (M) \times 10$	0.42 $\pm$ 0.15	0.57 $\pm$ 0.09	0.78	1.36
III. $K_D = \frac{k_{-1}}{k_{+1} - 7}$ (M) $\times 10$	0.41	0.55	1.01	1.78

Es zeigt sich eine weitgehende Übereinstimmung der Zahlenwerte, was für die Präzision der verschiedenen Methoden spricht.

Die Affinität der Herzmuskelzellmembranen von Meerschweinchen für g-Strophanthin ist 30-50 mal geringer, als die der digi-

taliseempfindlichen Spezies, wie z. B. Schaf ($K_D = 1.1 \times 10^{-9} M$), Rind ($K_D = 2.7 \times 10^{-9} M$), Mensch ($K_D = 2.7 \times 10^{-9} M$) oder Katze ($K_D = 4.2 \times 10^{-9} M$) (36).

An drei verschiedenen Organen des Meerschweinchens wurden die Dissoziationskonstanten des g-Strophanthin-Rezeptorkomplexes bestimmt:

-Erythrozyten: $K_D = 2.03 \times 10^{-7} M$ (Tab.18)

-Herzmuskel: $K_D = 1.13 \times 10^{-7} M$ (Tab.4)

-Skelettmuskel: $K_D = 0.48 \times 10^{-7} M$ (Tab. 16)

Die Bindung des g-Strophanthins an den Rezeptor erfolgt demnach am Skelettmuskel mit der höchsten Affinität. Sie ist temperatur- und zeitabhängig (Abb.15). Je höher die Temperatur, desto höher ist die Dissoziationskonstante K_D .

3.1.6 THERMODYNAMISCHE EIGENSCHAFTEN DER

g-STROPHANTHIN-REZEPTORBINDUNG

Die Aktivität membrangebundener Enzyme wird beeinflusst durch Gehalt und Zusammensetzung der Membranlipide. Auch für die ($Na^+ + K^+$)-ATPase verschiedener Spezies und Organe konnte dies gezeigt werden (14, 49, 65, 120, 145, 245, 249). Aufgrund des kooperativen Verhaltens der Lipidphase sind ca. 20-50 Lipidmoleküle für das Durchschleusen eines Moleküls durch eine Membran verantwortlich. Alle diese Lipidmoleküle müssen verflüssigt werden (134). Aus strukturanalytischen Untersuchungen ist bekannt, daß Phasenverschiebungen innerhalb der Membranen bei einer kritischen Temperatur Konformationsänderungen der Membranproteine verursachen (219). Dies kann

Auswirkungen auf die Bindungseigenschaften membrangebundener Rezeptoren haben, wie die Auftragung nach Arrhenius zeigt (Abb.16). Hierbei werden die Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{+1} und die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{-1} als Funktion der Temperatur aufgetragen und es zeigt sich ein Knick im Bereich von 20-10°C für die Assoziation. Wegen des Fehlens weiterer Meßpunkte konnte die kritische Temperatur nicht exakt festgelegt werden.

3.1.6.1 THERMODYNAMIK IM GLEICHGEWICHTSZUSTAND

Die Triebkraft ("Freiwilligkeit") einer Reaktion wird sowohl durch die Reaktionswärme, als auch durch die entstehende Unordnung bestimmt. Der Ausdruck Reaktionswärme oder Enthalpie steht für freiwerdende oder verbrauchte Energie und wird mit ΔH symbolisiert. Man gibt das Vorzeichen von ΔH vom Standpunkt der Stoffe aus. Wird Energie frei, z.B. bei exothermen Vorgängen, erhält ΔH also ein negatives Vorzeichen.

Der zweite Faktor für die Triebkraft ist die Unordnung oder Entropie, die mit dem Symbol ΔS abgekürzt wird. Eine Vergrößerung der Unordnung begünstigt den freiwilligen Ablauf eines Vorganges.

Nach der Gibbs-Helmholtzschen Gleichung sind Reaktionsenthalpie und Reaktionsentropie folgendermaßen miteinander verknüpft:

$$\Delta G = \Delta H - T \times \Delta S \quad \text{<VII>}$$

ΔG = Änderung der freien Energie

ΔH = Enthalpieänderung

T = absolute Temperatur in K

ΔS = Entropieänderung

Eine Änderung der freien Energie ΔG ist also das entscheidende Maß für die Triebkraft eines Vorganges. ΔG wird im Unterschied zu angelsächsischen Lehrbüchern im deutschsprachigen Schrifttum als "Freie Enthalpie" bezeichnet (159). Im Gleichgewichtszustand besteht keine Triebkraft mehr und ΔG ist gleich Null; bei allen freiwillig ablaufenden Vorgängen ist ΔG negativ.

Folgende thermodynamischen Parameter lassen sich berechnen:

1. Freie Energie ($=\Delta G$)

Verläuft eine Reaktion unter Standardbedingungen, erhält man die Änderung der freien Energie im Standardzustand ΔG . ΔG ist für jede Reaktion bei bestimmter Temperatur eine konstante Größe und läßt sich im Gleichgewichtszustand nach folgender Formel berechnen:

$$\Delta G^{\circ} = - R \times T \ln K_A \quad (\text{kcal/mol}) \quad \text{<VIII>}$$

ΔG° = Änderung der freien Energie unter Standardbedingungen

R = 1,99 cal/mol (universelle Gaskonstante)

T = absolute Temperatur in K

$K_A = 1/K_D$ = Affinitätskonstante

Je stärker negativ ΔG° ist, um so vollständiger verläuft der Vorgang (50).

2. Enthalpie unter Standardbedingungen (ΔH°)

Trägt man nach Van't Hoff $\ln 1/K_D$ als Funktion von $1/T$ in ein Diagramm ein, so läßt sich aus der Steigung der Geraden die Standardenthalpieänderung berechnen:

$$K = - \frac{\Delta H^{\circ}}{R}$$

$$\Delta H^{\circ} = - K \times R \quad \langle IX \rangle$$

ΔH° = Standardenthalpie

K = Steigung der Geraden in der Van't-Hoff Auftragung

3. Entropieänderung (ΔS°)

Durch Umformung der Gibbs-Helmholtz-Gleichung erhält man die Formel:

$$\Delta S^{\circ} = \frac{\Delta H^{\circ} - \Delta G^{\circ}}{T} \quad \langle X \rangle$$

ΔG° = freie Energie

Auf diese Weise ist es möglich, die Entropieänderung unter Standardbedingungen zu bestimmen.

Tab. 5: Thermodynamische Konstanten der g-Strophanthin-Rezeptor-Bindung im Gleichgewichtszustand unter Standardbedingungen

Spezies-Organ	Meerschweinchen-Herz			
Temperatur ($^{\circ}\text{C}$)	10	20	30	37
Temperatur (K)	283	293	303	310
Freie Energie ΔG° (kcal/mol)	-9.43	-9.62	-9.8	-9.87
Enthalpieänderung ΔH° (kcal/mol)	-4.79	-4.79	-4.79	-4.79
Entropieänderung ΔS° (cal/Grad/mol)	16.41	16.48	16.53	16.37
$-T \times \Delta S^{\circ}$ (kcal/mol)	-4.64	-4.86	-5.01	-5.07

Da die Steigungen der Geraden in der Arrheniusauftragung und damit die Geschwindigkeitskonstanten, nur geringgradig differiert, ist die Änderung der Affinitätskonstante in Abhängigkeit von der Temperatur auch nur mäßig ausgeprägt (Abb.16).

Die freie Energie nimmt um etwa 10 kcal/mol ab, d. h., bei der Bindung von g-Strophanthin an Herzglykosidrezeptoren von Herzmuskelzellmembranen handelt es sich um einen exergonischen

Prozeß. ΔG^0 ist nur mäßig durch Temperaturschwankungen beeinflusbar (Tab.5), entsprechend der geringgradigen Temperaturabhängigkeit der Affinitätskonstanten. Das negative ΔG^0 ist ein Hinweis auf die hohe Affinität der Reaktion (255). Aus der Van't-Hoff-Auftragung (Abb.17) wurde die Standardenthalpie des Systems mit $-4,8 \text{ kcal/mol}$ errechnet. Sie ist damit nicht so negativ, wie die freie Energie. Dies bedeutet eine Zunahme der Entropie durch den Bindungsprozeß. Die Entropieänderung beträgt konstant $16 \text{ cal} \times \text{Grad}^{-1} \text{ Mol}^{-1}$ (Tab. 5).

Zusammenfassend läßt sich über die thermodynamischen Eigenschaften der g-Strophanthin-Rezeptorbindung folgendes festhalten:

- Das System könnte bei geeigneter Versuchsanordnung ca. 10 kcal Arbeit erbringen.
- Bei der Bildung des g-Strophanthin-Rezeptorkomplexes werden 4,8 kcal Wärme frei.
- Die Entropieänderung ist nicht temperaturabhängig.

3.1.6.2 THERMODYNAMIK IM ÜBERGANGSZUSTAND

Für die Änderung der freien Energie unter Aktivierungsbedingungen ΔG^+ , also im Übergangszustand, gilt die Formel:

$$\Delta G^+ = - RT \ln k_{+1} + RT \ln \left(\frac{k \times T}{h} \right) \quad \langle X1 \rangle$$

$R = 1,99 \text{ cal} \times \text{mol}^{-1} \times \text{K}^{-1}$ Universelle Gaskonstante
 $K = 1,38 \times 10^{-23} \text{ J} \times \text{K}^{-1}$ Boltzmann-Konstante
 $h = 6,625 \times 10^{-34} \text{ W} \times \text{s}^2$ Plancksche-Konstante
 $T = \text{absolute Temperatur (K)}$

Bei einer chemischen Reaktion wird ein energiereicher Übergangszustand ("aktivierter Komplex") durchlaufen. Die Diffe-

renz zwischen dem Gipfel des Energieberges und dem Ausgangszustand bezeichnet man als Aktivierungsenergie E_A . Während die freie Energie ein Maß für die Triebkraft der Reaktion darstellt und dadurch die "Stabilität" bestimmt, ist die Größe der Aktivierungsenergie entscheidend für die "Reaktionsfähigkeit" (Reaktionsgeschwindigkeit = RG) (50).

Nach Arrhenius besteht zwischen der Aktivierungsenergie E_A , der absoluten Temperatur T und der Geschwindigkeitskonstanten K einer chemischen Reaktion folgende Beziehung:

$$K = A \times e^{-\frac{E_A}{R \times T}} \quad \text{Exponentielle Arrheniusgleichung}$$

$$\ln K = -\frac{E_A}{R \times T} \quad \text{Logarithmische Schreibweise} \quad \langle \text{XII} \rangle$$

K = Geschwindigkeitskonstante = RG/Konzentration

A = Proportionalitätsfaktor

E_A = Aktivierungsenergie

Bestimmt man also die Geschwindigkeitskonstante K bei verschiedenen Temperaturen und trägt $\ln K$ als lineare Funktion von $1/T$ graphisch auf, so läßt sich die Aktivierungsenergie aus der Neigung der entstehenden Geraden ermitteln (255).

$$N = -\frac{E_A}{R}$$

$$E_A = -N \times R \quad \langle \text{XIII} \rangle$$

N = Neigung der Geraden

E_A = Aktivierungsenergie

Je steiler die Gerade verläuft, umso höher ist die Aktivierungsenergie.

Für die Enthalpieänderung unter Aktivierungsbedingungen ΔH^+ gilt dann folgendes:

$$\Delta H^+ = E_A - RT \quad \text{<XIV>}$$

Die Entropieänderung im Übergangszustand ΔS^+ läßt sich mit der gleichen Formel berechnen, die für den Gleichgewichtszustand angewandt wurde.

Tab. 6: Thermodynamische Konstanten der g-Strophanthin-Rezeptorbindung im Übergangszustand unter Aktivierungsbedingungen.

Spezies-Organ	Meerschweinchen-Herz			
Temperatur ($^{\circ}\text{C}$)	10	20	30	37
Temperatur (K)	283	293	303	310
Freie Energie ΔG^+ (kcal/mol)	11.54	11.29	11.42	11.49
Aktivierungsenergie E_A (kcal/mol)	19.60	8.86	8.86	8.86
Enthalpieänderung ΔH^+ (kcal/mol)	19.04	8.27	8.25	8.24
Entropieänderung ΔS^+ (cal/Grad/mol)	26.50	-10.32	-10.46	-10.49
$-T \times \Delta S^+$ (kcal/mol)	-7.50	3.02	3.17	3.25

Ein eindeutiger Hinweis auf eine Energiebarriere ist das positive ΔG^+ (255).

Die Aktivierungsenergie E_A ist bei Temperaturen zwischen 10°C und 20°C deutlich erhöht; d. h., die Reaktionsfähigkeit ist eingeschränkt. Dieses Resultat korreliert gut mit dem Knick in der Arrhenius-Auftragung der Geschwindigkeitskonstanten bei den entsprechenden Temperaturen (Abb.16). Alle Zellmembranen bestehen aus Lipiden und Proteinen. Die Membranzmatrix setzt sich aus einer Lipiddoppelschicht zusammen, die hydrophile Oberflächen mit hydrophobem Inneren besitzt (Flüssig-Mosaik-Modell der Membranstruktur) (52, 234). Es ist anzunehmen, daß es hier zu einem temperaturabhängigen, reversiblen Übergang

der Kohlenwasserstoffketten von einer flüssigen in eine gelartige Phase kommt (219). Da die Membranproteine in diese Phospholipidschicht eingetaucht sind, ändert sich auch deren Konformation. In dieser Gelphase wird somit zur Überwindung des Energieberges mehr Aktivierungsenergie benötigt, damit g-Strophanthin an den Rezeptor binden kann. Um das unterschiedliche Verhalten der thermodynamischen Konstanten bei 37°C und 10°C zu verdeutlichen, wurden von beiden Temperaturbereichen Energieprofile gezeichnet (Abb. 18, 19).

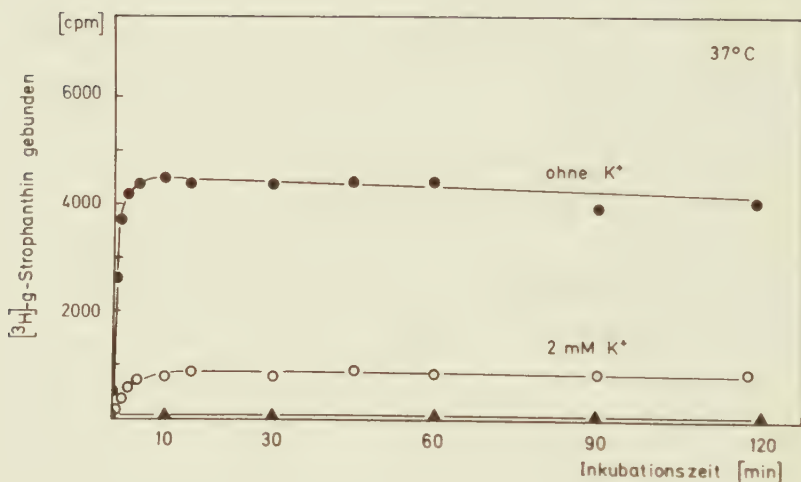


Abb. 12: Zeitabhängige Bindung von ^3H -g-Strophanthin an Herzmuskelzellmembranen unter Kaliumeinfluß

Herzmuskelzellmembranen (0.57 mg Protein; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität 0.11 U/mg Protein) wurden in 50 mM Imidazol/HCl-Puffer pH 7.25, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 , $4.1 \times 10^{-9}\text{ M}$ ^3H -g-Strophanthin bei 37°C in An- und Abwesenheit einer 2 mM KCl-Lösung inkubiert. Gesamtvolumen 2.0 ml .

Das überschüssige, nicht proteingebundene ^3H -g-Strophanthin wurde nach Ablauf der angegebenen Inkubationszeiten über Glasfilter rasch abfiltriert. Die proteingebundene Radioaktivität auf den Glasfiltern wurde gemessen.

- Gesamtbindung von ^3H -g-Strophanthin an Membranen
- Bindung bei 2 mM KCl im Inkubationsansatz
- ▲—▲ Unspezifische Bindung: ^3H -g-Strophanthinbindung trotz Gegenwart von 10^{-4} M nicht radioaktiv markiertem g-Strophanthin

Definitionsgemäß ist die spezifische Bindung die Differenz zwischen der Gesamtbindung und der unspezifischen Bindung.

Unter Kaliumeinfluß kommt es zu einer deutlichen Hemmung der ^3H -g-Strophanthinanlagerung an den Rezeptor und zu einer verzögerten Einstellung des Gleichgewichtszustandes.

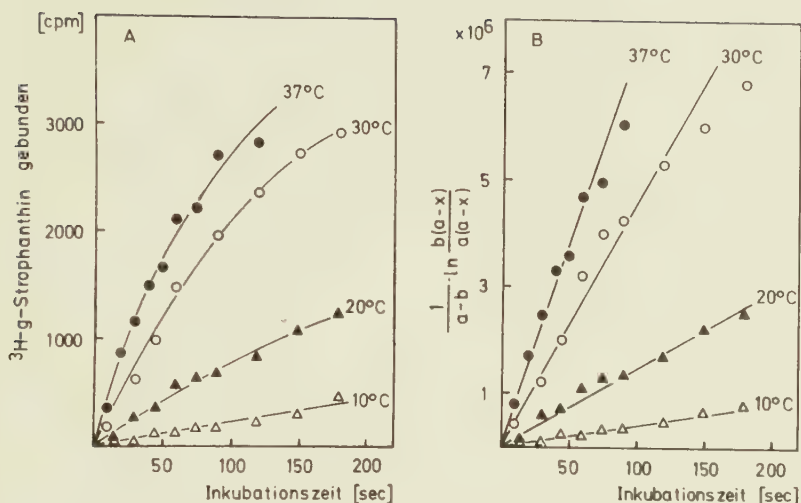


Abb. 13: Assoziation des ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes von Herzmuskelzellmembranen in Abhängigkeit von der Temperatur

Herzmuskelzellmembranen (0.33 mg Protein; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität 0.08 U/mg Protein) wurden in 50 mM Imidazol/HCl-Puffer pH 7.25, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 , $4.1 \times 10^{-6} \text{ M}$ ^3H -g-Strophanthin bei 37, 30, 20, 10 ($^\circ\text{C}$) inkubiert. Gesamtvolumen 2.0 ml.

Die Anlagerung von ^3H -g-Strophanthin an den Rezeptor wurde zu den angegebenen Zeiten durch eisgekühltes Wasser rasch unterbrochen. Nach Abfiltrieren über Glasfaserfilter (Whatman GF/C) wurde die proteingebundene Radioaktivität gemessen.

- A: Zeitabhängige membrangebundene Radioaktivität, aufgetragen in cpm bei verschiedenen Temperaturen.
- B: Die zeit- und temperaturabhängigen Meßwerte von A sind in die Reaktionsgleichung für Reaktionen 2. Ordnung eingesetzt worden. Aus der Steigung der Geraden wurden die verschiedenen Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten (k_{+1}) errechnet.

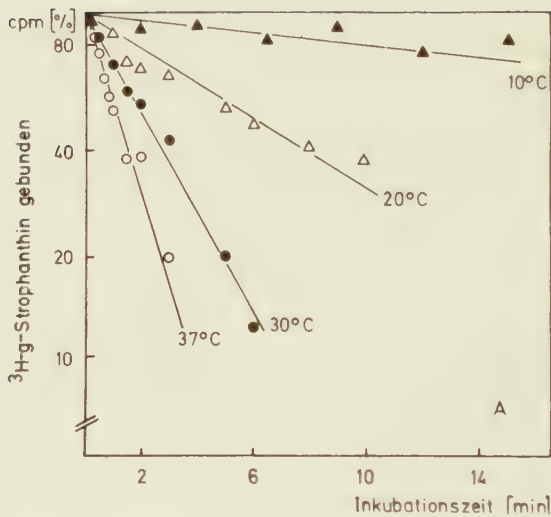


Abb. 14: Dissoziation des ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes von Herzmuskelzellmembranen in Abhängigkeit von der Temperatur

Herzmuskelzellmembranen (11.59 mg Protein; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität 0.04 U/mg Protein) wurden in 50 mM Imidazol/HCl-Puffer pH 7.25, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 , 4.1×10^{-9} M ^3H -g-Strophanthin bei 37°C inkubiert. Gesamtvolumen 2.0 ml.

Dieser ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Komplex wurde mit 10^{-3} M unmarkiertem g-Strophanthin bei der angegebenen Temperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte die Messung des noch gebundenen ^3H -g-Strophanthins.

A: Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1}

Aus der unterschiedlichen Neigung der Geraden wurden die verschiedenen Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten (k_{-1}) errechnet.

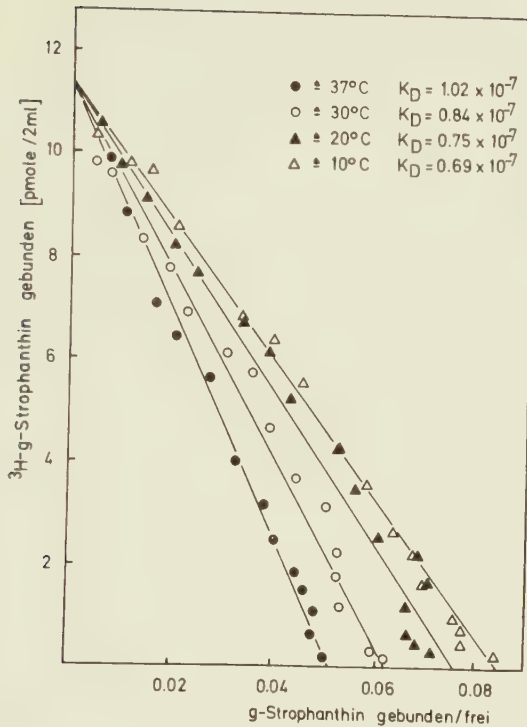


Abb. 15: Konzentrationsabhängige Bindung von ^3H -g-Strophanthin an Herzmuskelzellmembranen in Abhängigkeit von der Temperatur

Herzmuskelzellmembranen (0.33 mg Protein; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität 0.22 U/mg Protein) wurden 120 min. in 50 mM Imidazol/HCl-Puffer pH 7.25, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 , $4.1 \times 10^{-5} \text{ M}$ ^3H -g-Strophanthin bei 37, 30, 20, 10 ($^{\circ}\text{C}$) inkubiert. Gesamtvolumen 2.0 ml.

Die Reaktion wurde nach Ablauf der Inkubationszeit durch rasches Abfiltrieren (Whatman GF/C) unterbrochen. Die unspezifische Bindung wurde in Gegenwart von 10^{-3} M unmarkiertem Strophanthin bestimmt und von der proteingebundenen Radioaktivität auf den Filtern subtrahiert.

Die Bindungsdaten sind nach Scatchard aufgetragen und die Dissoziationskonstanten aus dem Anstieg der Geraden errechnet worden.

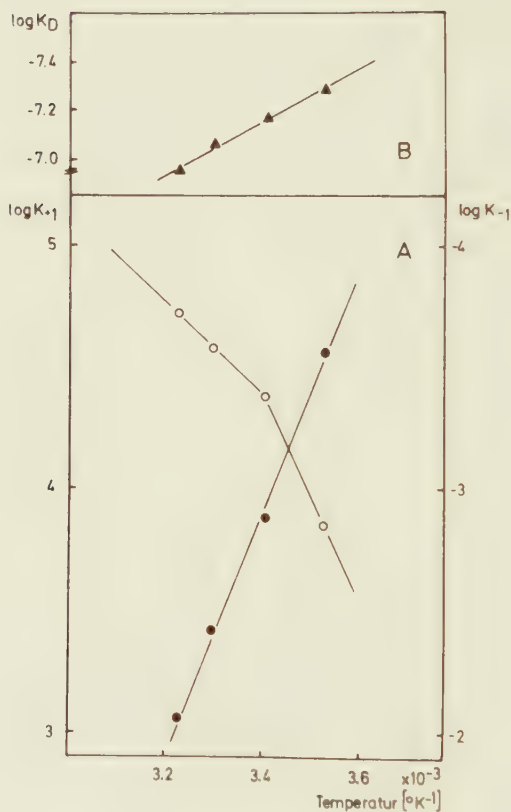


Abb. 16: Arrhenius-Auftragung der Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten von Herzmuskelzellmembranen in Abhängigkeit von der Temperatur.

- A: Logarithmische Auftragung der Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten (○) und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten (●) aus Tab. I als Funktion von $1/T$. Aus den unterschiedlichen Neigungen der Geraden der Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten wurden die Aktivierungsenergien errechnet.
- B: Auftragung des Logarithmus der reziproken Dissoziationskonstanten $1/K_D$ (▲) gegen die Temperaturen $1/T$.

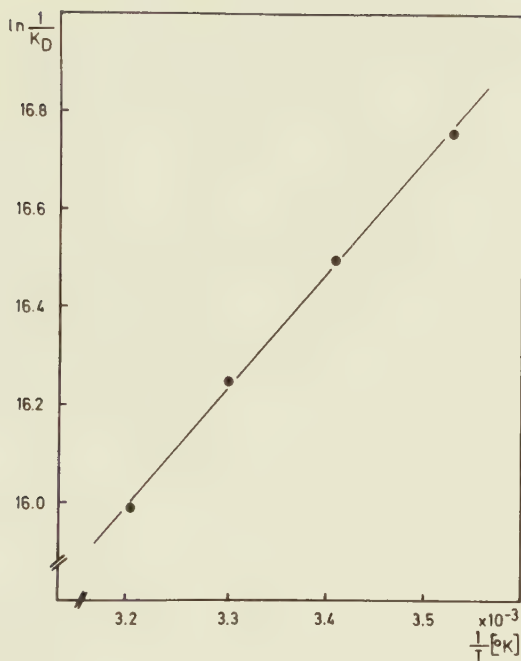


Abb. 17: Van't-Hoff-Auftragung des Logarithmus der reziproken Gleichgewichtskonstanten von Herzmembranen gegen die entsprechenden Temperaturen

Aus der Steigung der Geraden wurde ΔH^0 , d. h., die Enthalpieänderung unter Standardbedingungen ermittelt.

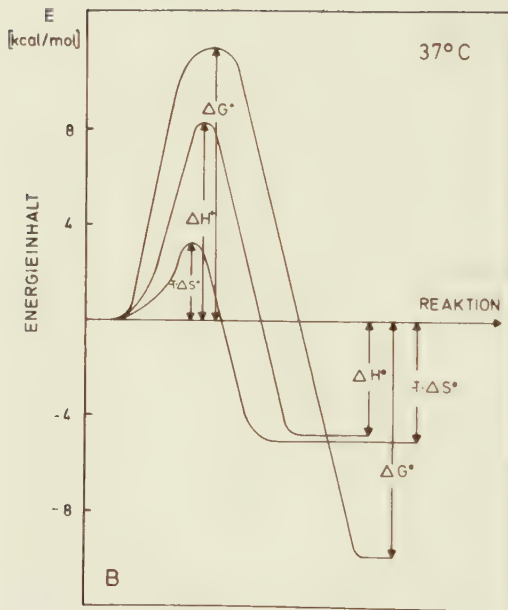


Abb. 18

Energiediagramm der g-Strophanthin-Rezeptor-Bindung an Herzmuskelzellmembranen bei 37°C

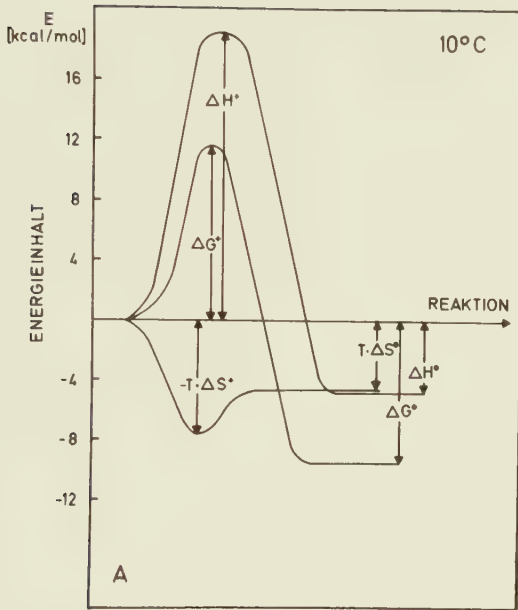


Abb. 19
Energieprofil der *g*-Strophanthin-Rezeptor-Bindung an
Herzmuskelzellmembranen bei 10°C

3.2 DIE WIRKUNG VON KALIUM AUF DIE g-STROPHANTHIN- REZEPTORBINDUNG

Zur Therapie von Digitalisintoxikationen hat sich die Gabe von Kalium bewährt (90). Seine antagonistische Wirkung ist aus Abb.20 ersichtlich. Kalium wurde bei diesen Versuchen erst nach erfolgter ^3H -g-Strophanthin-Rezeptorbindung im Gleichgewichtszustand dem Inkubat zugegeben. Es zeigt sich eine deutliche Abnahme der Menge des membrangebundenen Strophanthins. Außerdem wird die Zeit bis zum Erreichen des Äquilibriums etwas verlängert (Abb. 12). Bei ansteigenden Kaliumkonzentrationen (Abb. 20) nimmt die Menge des rezeptor-gebundenen ^3H -g-Strophanthins deutlich ab, weil Kalium durch eine Konformationsänderung die Affinität der Bindungsstellen reduziert. Aus der Hemmkurve wurde unter Äquilibriumbedingungen die halbmaximale Hemmkonzentration I_{50} ($= 0,5 \text{ mM}$) für die Herzglykosidrezeptorbindung bestimmt (Abb.21). In Anwesenheit von Kaliumionen ist die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{+1} verändert, die Bindung an den Rezeptor deutlich verlangsamt (Abb.22). Die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1} hingegen, bleibt trotz Gegenwart von 1 mM K^+ konstant und somit die Abdissoziation des Liganden vom Rezeptor unbeeinflusst (Abb.23). Dies führt zwangsläufig zu einer Änderung der Dissoziationskonstante K_D , die sich aus dem Verhältnis dieser Geschwindigkeitskonstanten k_{-1}/k_{+1} errechnen läßt. Im Bindungsexperiment mit steigender Strophanthinkonzentration (Abb.24) zeigt sich in Gegenwart von 1 mM Kalium ein Anstieg der Dissoziationskonstanten um den Faktor

3,5. Dies entspricht einer herabgesetzten Affinität des Rezeptors für g-Strophanthin unter Kaliumeinfluß (6, 86, 98). Die Bindungskapazität, also die maximale Anzahl der Bindungsstellen, bleibt bei den untersuchten Kaliumkonzentrationen unverändert (Abb.25,24). Der lineare Kurvenverlauf in der Auftragung nach Scatchard weist auf eine einheitliche Rezeptorart hin. Auch in der doppelt reziproken Auftragung der Bindungsdaten nach Lineweaver-Burk zeigt sich der Affinitätsverlust für Herzglykoside durch die Kaliumionen bei den jeweiligen Konzentrationen (Abb.26). Eine therapeutische Gabe von Kalium bei leichter Digitalisüberdosierung und z. B. tachykarden Herzrhythmusstörungen ist deshalb empfehlenswert (96). Die Vergiftung ist reversibel, weil das von Rezeptoren abdiffundierende Glykosid wegen der verlangsamten Assoziationsgeschwindigkeit nur sehr langsam rückgebunden wird (100). Bei Intoxikationen mit extremen Digitalisdosen, bei denen in der frühen Vergiftungsphase sogar eine therapiefraktionäre Hyperkaliämie auftreten kann, ist dieser Therapieverschlagnatürlich nicht indiziert (24).

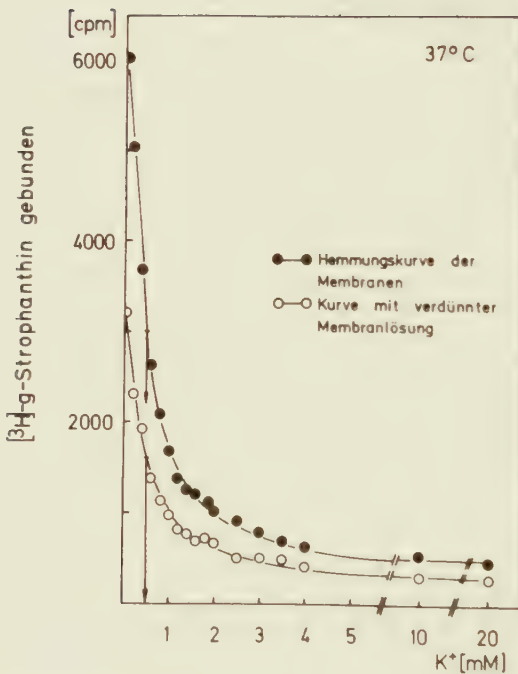


Abb. 20: Konzentrationsabhängiger Kaliumeffekt auf die Bindung von ³H-g-Strophanthin an Herzmuskelzellmembranen

Herzmuskelzellmembranen (0.025 mg Protein; (Na⁺+K⁺)-ATPase-Aktivität 0.225 U/mg Protein) wurden in 50₉mM₃ Imidazol/HCl-Puffer pH 7.25, 3 mM MgCl₂, 3 mM Imidazol/PO₄, 4.1x10⁻⁹ M ³H-g-Strophanthin bei 37°C in An- und Abwesenheit einer 1 mM KCl-Lösung inkubiert.

Das überschüssige, nicht proteingebundene ³H-g-Strophanthin wurde nach Ablauf der angegebenen Inkubationszeiten über Glasfilter rasch abfiltriert. Die proteingebundene Radioaktivität auf den Glasfiltern wurde gemessen.

Bei den Kontrollwerten wurde Magnesiumphosphatpuffer zugegeben.

●—● Hemmungskurve der Membranen
○—○ Kurve mit verdünnter Membranlösung

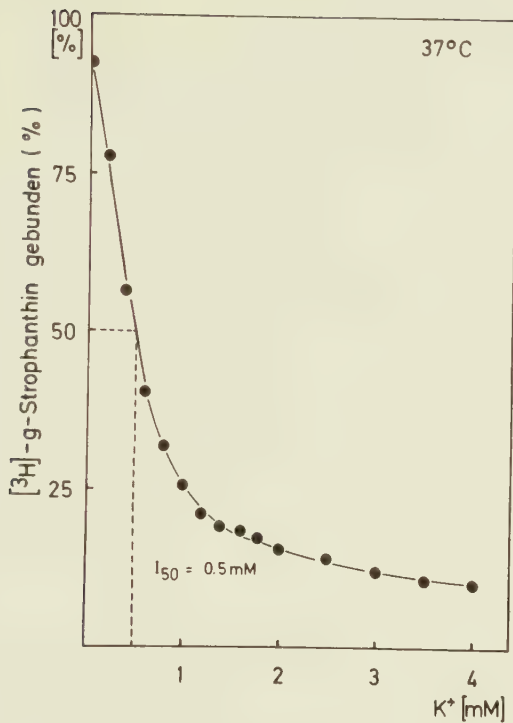


Abb. 21: Bestimmung der halbmaximalen Hemmkonzentration I_{50} von Kalium für die ^3H -g-Strophanthinbindung an Herzmuskelzellmembranen

Herzmuskelzellmembranen (0.16 mg Protein; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität 0.092 U/mg Protein) wurden 120 min. in 50 mM Imidazol/HCl-Puffer pH 7.25, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 , 4.1×10^{-6} M ^3H -g-Strophanthin bei 37°C und mit steigenden KCl-Konzentrationen inkubiert. Gesamtvolumen 2.0 ml.

●—● Hemmungskurve der Membranen

Kalium reduziert die Receptoraffinität für g-Strophanthin in Abhängigkeit von der Konzentration.

Aus der Hemmungskurve unter Äquilibriumbedingungen wurde die Kaliumkonzentration für die halbmaximale Hemmung der ^3H -g-Strophanthinbindung ermittelt: $I_{50} = 0,5 \text{ mM } K^+$

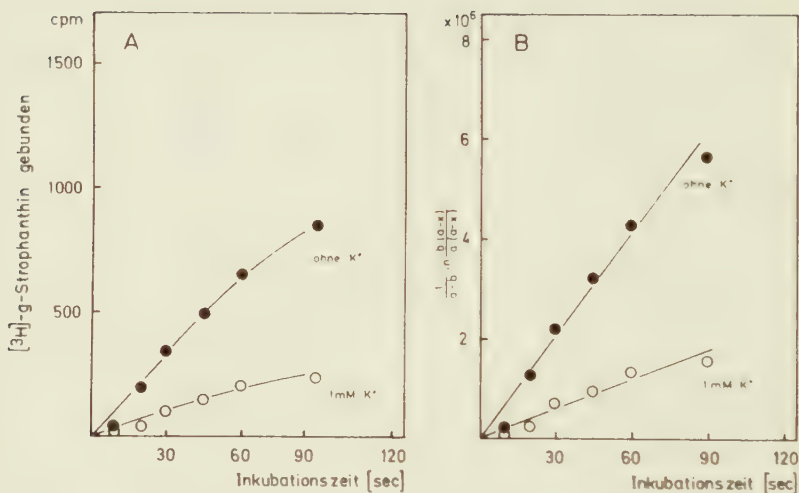


Abb. 22: Kaliumeffekt auf die Assoziationsgeschwindigkeit des ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes von Herzmuskelzellmembranen unter Kaliumeinfluss

Herzmuskelzellmembranen (0.015 mg Protein; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität 3.51 U/mg Protein) wurden in 50 mM Imidazol/HCl-Puffer pH 7.25, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 , 4.1×10^{-9} M ^3H -g-Strophanthin bei 37°C und den angegebenen KCl-Konzentrationen inkubiert. Gesamtvolumen 2.0 ml.

Das überschüssige, nicht proteingebundene ^3H -g-Strophanthin wurde nach Ablauf der angegebenen Inkubationszeiten über Glasfilter rasch abfiltriert. Die membrangebundene Radioaktivität auf den Glasfiltern wurde gemessen.

a = g-Strophanthin-Anfangskonzentration (4.1 nM)

b = initiale Rezeptorkonzentration (8.1 nM)

x = Menge des ^3H -g-Rezeptorkomplexes zur Zeit t (sec)

Die Meßwerte von A sind bei B in die Reaktionsgleichung für bimolekulare Reaktionen eingesetzt worden. Aus dem Anstieg der Geraden wurden die Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten (k_{+1}) errechnet.

$$\begin{aligned} \bullet & \bullet \text{ ohne Kalium: } k_{+1} = 5.71 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1} \\ \circ & \circ \text{ 1 mM Kalium: } k_{+1} = 1.78 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1} \end{aligned}$$

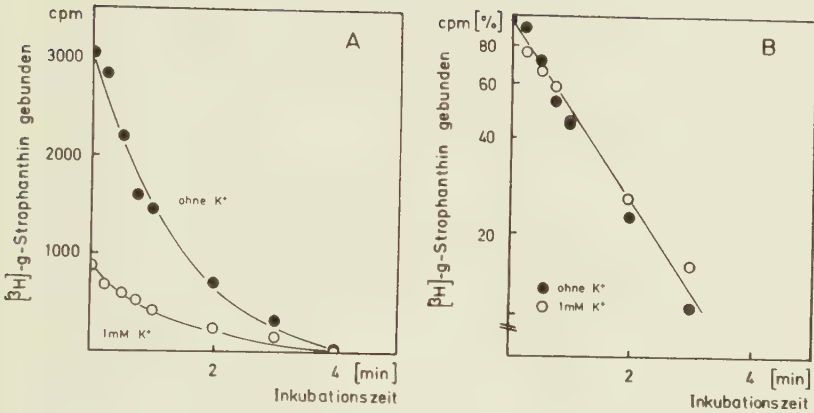


Abb. 23: Kaliumeffekt auf die Dissoziation des ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes von Herzmuskelzellmembranen unter Kaliumeinfluß

Herzmuskelzellmembranen (0.015 mg Protein; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität 3.51 U/mg Protein) wurden in 50 mM Imidazol/HCl-Puffer pH 7.25, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 , 4.1×10^{-9} M ^3H -g-Strophanthin bei 37°C inkubiert. Gesamtvolumen 2.0 ml.

Bei 30.000 U/min wurde nach 2 Stunden 30 min. lang abzentrifugiert und das Sediment in 6.0 ml 50 mM Imidazol/HCl pH 7.25 homogenisiert. Von diesem ^3H -g-Strophanthin-Rezeptorkomplex wurden aliquote Teile (0.27 mg Protein) in 50 mM Imidazol/HCl pH 7.25, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 , 10^{-3} M unmarkiertem g-Strophanthin unterschiedlich lang inkubiert. In An- und Abwesenheit von KCl wurde die Menge der noch membrangebundenen Radioaktivität gemessen;

●—● ohne Kalium
○—○ 1 mM Kalium

Kalium hat auf die Abdissoziationsgeschwindigkeit des markierten g-Strophanthins vom Rezeptor keinen Einfluß.

Aus der Neigung der Geraden wurde die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante $k_{-1} = 6.2 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ errechnet.

In Abb. B sind die Werte aus Abb. A logarithmisch aufgetragen, wobei der Wert zum Zeitpunkt 0 als 100 % Ausgangswert gilt.

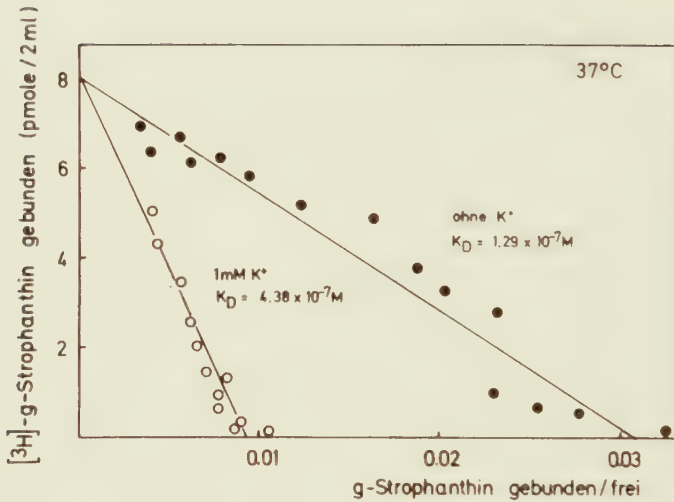


Abb. 24: Konzentrationsabhängige Bindung von ³H-g-Strophanthin an Herzmuskelzellmembranen in Gegenwart von 1 mM K⁺

Herzmuskelzellmembranen (0.015 mg Protein; (Na⁺+K⁺)-ATPase-Aktivität 3,51 U/mg Protein) wurden 120 min. in 50 mM Imidazol/HCl-Puffer pH 7.25, 3 mM MgCl₂, 3 mM Imidazol/PO₄, 4.1 × 10⁻⁶ M ³H-g-Strophanthin bei 37°C und mit steigenden KCl-Konzentrationen inkubiert. Gesamtvolumen 2.0 ml.

Die Auftragung der experimentellen Daten erfolgte nach Scatchard.

- ● ohne Kalium
- — ○ 1 mM Kalium

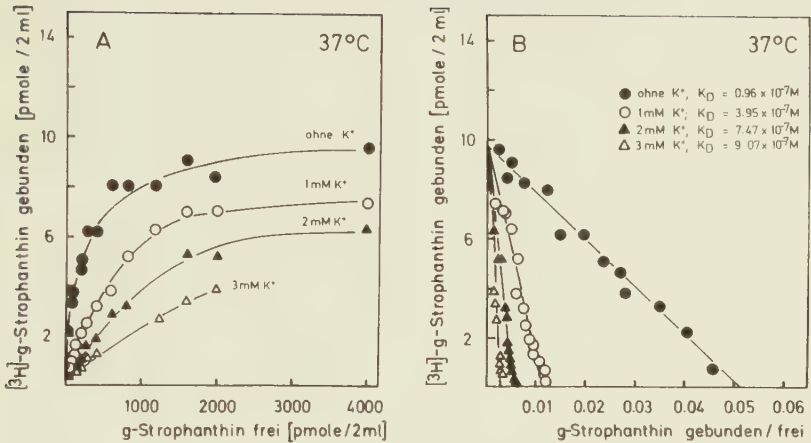


Abb. 25: Kaliumeffekte auf die konzentrationsabhängige Bindung von ^3H -g-Strophanthin an Herzmuskelzellmembranen

Herzmuskelzellmembranen (0.16 mg Protein; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität 0.11 U/mg Protein) wurden 120 min. in 50 mM Imidazol/HCl-Puffer pH 7.25, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 , $4.1 \times 10^{-7} \text{ M}$ ^3H -g-Strophanthin bei 37°C und verschiedenem Kaliumgehalt mit steigenden g-Strophanthin-Konzentrationen inkubiert. Gesamtvolumen 2.0 ml.

Der Versuch wurde bei folgenden Kaliumkonzentrationen durchgeführt:

- —● ohne Kalium; $K_D = 0.96 \times 10^{-7} \text{ M}$
- —○ 1 mM Kalium; $K_D = 3.95 \times 10^{-7} \text{ M}$
- ▲ —▲ 2 mM Kalium; $K_D = 7.45 \times 10^{-7} \text{ M}$
- △ —△ 3 mM Kalium; $K_D = 9.07 \times 10^{-7} \text{ M}$

Die Bindungsdaten in Abb. A sind in Abb. B nach Scatchard aufgetragen worden.

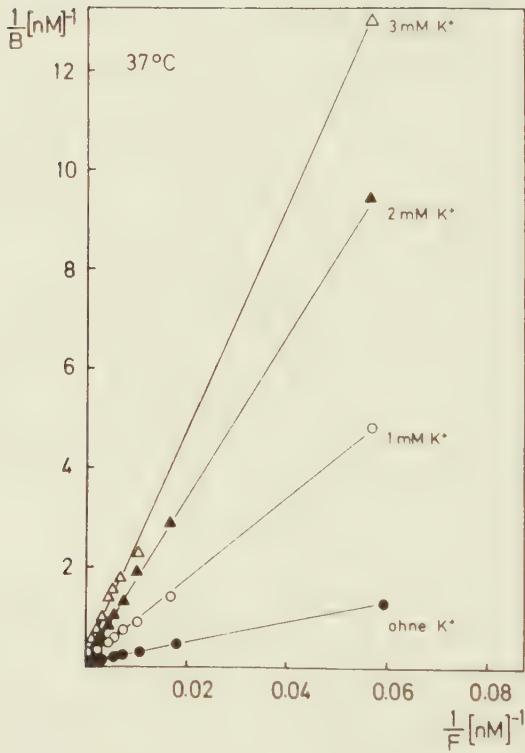


Abb. 26: Lineweaver-Burk-Auflage der konzentrationsabhängigen Bindung von ³H-g-Strophanthin an Herzmuskelzellen unter Kaliumeinfluß

Die Werte der Abbildung 25 wurden hierzu doppelt reziprok aufgetragen.

- —● ohne Kalium
- —○ 1 mM Kalium
- ▲ —▲ 2 mM Kalium
- Δ —Δ 3 mM Kalium

Kalium erniedrigt deutlich die Affinität des Herzglykosidrezeptors, die Anzahl der Bindungsstellen bleibt hingegen konstant.

3.3 Bindungsstudien und Kontraktionsversuche bei

Kaliummangel

Zu den häufigsten Ursachen eines allgemeinen Kaliummangels zählen renale (chronische Diuretikatherapie) oder enterale Kaliumverluste (Laxantienabusus). Im Gegensatz zu einer akuten Hypokaliämie, wie sie bei dialysepflichtigen Patienten auftreten kann, tritt das Kaliummangelsyndrom bei der chronischen Hypokaliämie erst bei relativ niedrigen Serumkaliumkonzentrationen klinisch in Erscheinung (100). Es ist bekannt, daß bei Hypokaliämie die Sensitivität des Herzens gegenüber Glykosiden erhöht ist, also eine Digitalisüberempfindlichkeit besteht. Die Nebenwirkungen entsprechen denen einer Überdosierung: Herzrhythmusstörungen, Erbrechen, Sehstörungen u.a.

Die Untersuchungen über die Folgen eines Kaliummangels wurden an folgenden Organen durchgeführt:

- 1. Herzmuskulatur: Ventrikel-, Vorhof-, Papillarmuskeln
- 2. Skelettmuskulatur: M. soleus
- 3. Blut: Erythrozyten

Die Meerschweinchen wurden zwei Wochen lang, entweder mit normalem Kontrollfutter oder kaliumarmer Diät, ernährt (2.2.1).

3.3.1 ABHÄNGIGKEIT DER BINDUNG VON LEBENSALTER UND pH-WERT

Die Anzahl von Herzglykosid-Bindungsstellen ist durch verschiedene Faktoren beeinflussbar. Dazu zählt neben Hypo- und Hyperthyreose (23, 91) und Kaliummangel (88, 190) auch das Lebensalter (146, 252). Bei Meerschweinchen verringert sich

die Anzahl der ^3H -g-Strophanthin-Rezeptoren von der Geburt bis zum ausgewachsenen Tier um ca. 60% (147). Um das Lebensalter als Einflußgröße auszuschalten, wurden nur 24 - 32 Wochen alte Tiere verwendet. In diesem Zeitraum bleibt bei ihnen die Anzahl der Bindungsstellen/g Feuchtgewicht im Skelettmuskel stabil (147). Klinisch ist bekannt, daß ein Kaliummangel, z. B. diuretika induziert, häufig mit einer metabolischen Alkalose verknüpft ist. Eine Alkalose aber führt zu Erniedrigung der Rezeptoraffinität für Herzglykoside (95, 200). Um eine wirksame Alkalose festzustellen, wurde arterialisiertes Blut durch intrakardiale Punktion des linken Ventrikels gewonnen und die Blutgase bestimmt.

Tab. 7: Arterielle Blutgase nach kaliumarmer Diät.

Nahrung	normal n = 10	kaliumarm n = 9	
pH	7.352 $\pm$ 0.008	7.395 $\pm$ 0.017	p = 0.041
pO ₂ Torr	62.29 $\pm$ 2.919	67.125 $\pm$ 3.035	p = 0.281
pCO ₂ Torr	34.05 $\pm$ 1.343	28.611 $\pm$ 4.236	p = 0.012

Anhand der pH-Werte zeigt sich eine Alkalisierung des Blutes durch den Kaliummangel. Der Sauerstoffpartialdruck blieb unverändert, im Gegensatz zum Kohlensäuredruck, der deutlich abfiel. Zum Vergleich wurden die Blutgase auch im venösen Blut durch Punktion des rechten Ventrikels bestimmt.

Tab. 8: Venöse und arterielle Blutgase nach normaler Ernährung

Nahrung	venös n = 3	arteriell n = 10	
pH	7.246 $\pm$ 0.082	7.352 $\pm$ 0.008	p = 0.157
pO ₂ Torr	29.8 $\pm$ 2.971	62.29 $\pm$ 2.919	p = 0.0003
pCO ₂ Torr	48.43 $\pm$ 2.18	34.05 $\pm$ 1.343	p = 0.002

3.3.2 KÖRPERGEWICHT UND KALIUMGEHALT NACH KALIUMARMER DIÄT

Die Meerschweinchen wurden 14 Tage entweder mit kaliumarmer Diät oder Kontrollfutter versorgt (2.2.1) Vor und nach der Diät wurden die Tiere mit einer Präzisionswaage (Sartorius Typ 2254) gewogen. Es zeigte sich eine signifikante Gewichtsreduktion von etwa 10 %.

Tab. 9: Körpergewicht nach kaliumarmer Diät

Nahrung	normal n = 11	kaliumarm n = 11	
Tiergewicht g	679 $\pm$ 53	615 $\pm$ 51	p= 0.00008

Die Auswirkungen der kaliumarmen Diät auf den Elektrolythaushalt wurden durch Messungen des Serumkaliums und der Ganzkörperkaliumgehalts kontrolliert. Zur Serumkaliumbestimmung wurde intrakardial punktiert (2.2.3, 2.2.5).

Tab. 10: Kaliumkonzentration im Serum nach kaliumarmer Diät

Nahrung	normal n = 12	kaliumarm n = 13	
Kaliumkonzentration im Serum mval/L	4.79 $\pm$ 0.23	3.29 $\pm$ 0.21	p= 0.00008

Durch die kaliumarme Ernährung kommt es zu einer Hypokaliämie. Untersuchungen aus dem Jahre 1971 (81) zeigen abweichende Resultate für den Serumkaliumgehalt:

-Normale Tiere: 4.3 $\pm$ 0.7 mval/L;

-kaliumarme Tiere: 2.5 $\pm$ 0.4 mval/L

Diese Diskrepanz ist wahrscheinlich auf die damals etwas längere Diätdauer von bis zu 18 Tagen und das geringere Tiergewicht von 200 - 400 g zurückzuführen. Das Körpergewicht der Meerschweinchen bei unseren Untersuchungen war ungefähr doppelt so groß.

Zusätzlich wurde das Ganzkörperkalium bestimmt (2.2.5.2)

Tab. 11: Ganzkörperkaliumgehalt nach kaliumarmer Diät

Nahrung	normal n = 5	kaliumarm n = 5	p = 0.0085
Nettoimpulse pro Tierpaar	887 $\pm$ 36	669 $\pm$ 38	

Die Meerschweinchen mußten paarweise gemessen werden, da die Gammastrahlung eines einzelnen Tieres zu gering ist, um sich von der Untergrundstrahlung im Bodycounter abzuheben. Die kaliumarme Diät führte zu einer deutlichen Reduktion des Gesamtkörperkaliums.

3.3.3 KONSTANTE HERZGLYKOSIDREZEPTORENZAHL AM HERZMUSKEL TROTZ HYPOKALIÄMIE

Aus den Voruntersuchungen wurde die Zeit bis zur Äquilibration ausgetestet (Abb.27). Bei diesem Versuch wurde außerdem einigen Proben Kalium bis zu einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben. Die Bindungskurve zeigt deutlich die Auswirkung der gesteigerten Abdissoziation durch Kalium auf die Rezeptoraffinität. Für die Experimente wurden Inkubationszeiten von einer Stunde gewählt. Bindungskapazität, Dissoziationskonstante und $(Na^+ + K^+)$ -ATPase-Aktivität wurden im Herzmuskelhomogenat (2.2.3.1) folgender Organteile bestimmt:

1. Linker Ventrikel
2. Rechter Ventrikel
3. Linker Vorhof
4. Rechter Vorhof

Um genügend Homogenat für die Bindungsexperimente zu erhalten, wurden mindestens vier Vorhöfe pro Einzelexperiment benötigt. Zu jeder Ergebnistabelle wurde ein Experiment graphisch dargestellt (Abb. 28 - 31).

Tab. 12: Untersuchungen am linken Ventrikel nach kaliumarmer Diät (Abb. 28)

Nahrung	normal n = 9	kaliumarm n = 7	
Herzglykosidrezeptoren pro mg Feuchtgewicht $\times 10^{11}$	1.32 ± 0.14	1.21 ± 0.20	p=0.649
Herzglykosidrezeptoren pro mg Protein $\times 10^{11}$	12.21 ± 1.46	8.88 ± 1.28	p=0.107
Dissoziationskonstante K_D (M) $\times 10^7$	1.00 ± 0.05	1.19 ± 0.07	p=0.054
Kaliumkonzentration im Serum (mval/L)	5.42 ± 0.28	3.42 ± 0.37	p=0.001
(Na ⁺ +K ⁺)-ATPase- Aktivität (%)	19.50 ± 2.79	15.89 ± 4.12	p=0.482
(Na ⁺ +K ⁺)-ATPase- Aktivität pro mg Protein (U/mg)	0.031 ± 0.006	0.027 ± 0.010	p=0.715

Tab. 13: Untersuchungen am rechten Ventrikel nach kaliumarmer Diät (Abb. 29)

Nahrung	normal n = 7	kaliumarm n = 7	
Herzglykosidrezeptoren pro mg Feuchtgewicht $\times 10^{11}$	1.67 ± 0.15	1.34 ± 0.25	p=0.293
Herzglykosidrezeptoren pro mg Protein $\times 10^{11}$	14.11 ± 1.54	11.58 ± 2.33	p=0.396
Dissoziationskonstante K_D (M) $\times 10^7$	1.09 ± 0.10	1.10 ± 0.14	p=0.953
Kaliumkonzentration im Serum (mval/L)	5.42 ± 0.32	3.42 ± 0.37	p=0.001
(Na ⁺ +K ⁺)-ATPase- Aktivität (%)	14.17 ± 2.97	8.65 ± 1.78	p=0.147
(Na ⁺ +K ⁺)-ATPase- Aktivität pro mg Protein (U/mg)	0.025 ± 0.007	0.025 ± 0.007	p=0.999

Tab. 14: Untersuchungen am linken Vorhof nach kaliumarmer Diät (Abb. 30)

Nahrung	normal n = 5	kaliumarm n = 5	
Herzglykosidrezeptoren pro mg Feuchtgewicht $\times 10^{11}$	0.69 ± 0.17	0.65 ± 0.18	p=0.878
Herzglykosidrezeptoren pro mg Protein $\times 10^{11}$	4.78 ± 0.80	5.72 ± 1.15	p=0.569
Dissoziationskonstante K_D (M) $\times 10^7$	1.00 ± 0.11	0.95 ± 0.06	p=0.690
Kaliumkonzentration im Serum (mval/L)	4.81 ± 0.17	3.33 ± 0.14	p=0.0023
(Na + K)-ATPase- Aktivität (%)	7.36 ± 2.10	11.29 ± 0.53	p=0.146
(Na + K)-ATPase- Aktivität pro mg Protein (U/mg)	0.019 ± 0.007	0.040 ± 0.019	p=0.346

Tab. 15: Untersuchungen am rechten Vorhof nach kaliumarmer Diät (Abb. 31)

Nahrung	normal n = 5	kaliumarm n = 5	
Herzglykosidrezeptoren pro mg Feuchtgewicht $\times 10^{11}$	0.66 ± 0.09	0.64 ± 0.09	p=0.848
Herzglykosidrezeptoren pro mg Protein $\times 10^{11}$	5.06 ± 0.78	8.06 ± 2.15	p=0.252
Dissoziationskonstante K_D (M) $\times 10^7$	1.26 ± 0.19	0.97 ± 0.17	p=0.280
Kaliumkonzentration im Serum (mval/L)	4.81 ± 0.17	3.33 ± 0.19	p=0.023
(Na + K)-ATPase- Aktivität (%)	17.91 ± 3.93	9.56 ± 2.46	p=0.096
(Na + K)-ATPase- Aktivität pro mg Protein (U/mg)	0.04 ± 0.016	0.015 ± 0.008	p=0.212

Die Zahl der Glykosidbindungsstellen war im Herzmuskelhomogenat trotz Kaliummangel konstant und in den Ventrikeln annähernd doppelt so groß wie in den Vorhöfen (Tab. 12 - 15). Ein Unterschied in der Rezeptorenzahl zwischen linker und rechter Herzseite war nicht feststellbar.

Vergleicht man die Dissoziationskonstanten K_D , die in den Herzmuskelhomogenaten aller vier Herzhäute gemessen wurden, so

zeigt sich weder bei den kaliumarm ernährten Meerschweinchen noch bei den Kontrolltieren eine signifikante Änderung.

Die Dissoziationskonstanten K_D von Herzmuskelkomogenaten (1.09×10^{-7} M) und von $(Na^+ + K^+)$ -ATPase-haltigen Herzmuskelzellmembranen (1.13×10^{-7} M) waren fast identisch.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß in Herzmuskelhomogenaten weder die Anzahl der Glykosidbindungsstellen noch die Dissoziationskonstante K_D bei der in unseren Versuchen erreichten Kaliumsenkung verändert wurden.

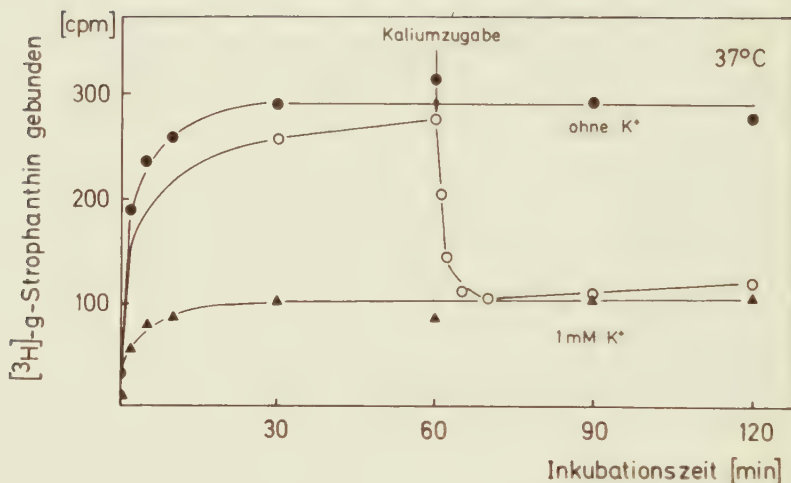


Abb. 27: Kaliumeffekt auf die zeitabhängige Bindung von ^3H -g-Strophanthin an Herzmuskelzellmembranen

Herzmuskelzellmembranen (0.025 mg Protein; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase-Aktivität}$ 0.225 U/mg Protein) wurden in 50 mM Imidazol/HCl-Puffer pH 7.25, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 , $4.1 \times 10^{-9}\text{ M}$ ^3H -g-Strophanthin bei 37°C in An und Abwesenheit einer 1 mM KCl-Lösung inkubiert. Gesamtvolumen 2.0 ml .

Das überschüssige, nicht proteingebundene ^3H -g-Strophanthin wurde nach Ablauf der angegebenen Inkubationszeiten über Glasfilter rasch abfiltriert. Die proteingebundene Radioaktivität auf den Glasfiltern wurde gemessen.

- — ● Gesamtbindung von ^3H -g-Strophanthin an Membranen als Kontrollkurve ohne Kalium
- — ○ Bindung während Zugabe einer 1 mM KCl-Lösung
- ▲ — ▲ Bindung bei 1 mM KCl im Inkubationsansatz

Bei den Kontrollwerten wurde Magnesiumphosphatpuffer zugegeben.

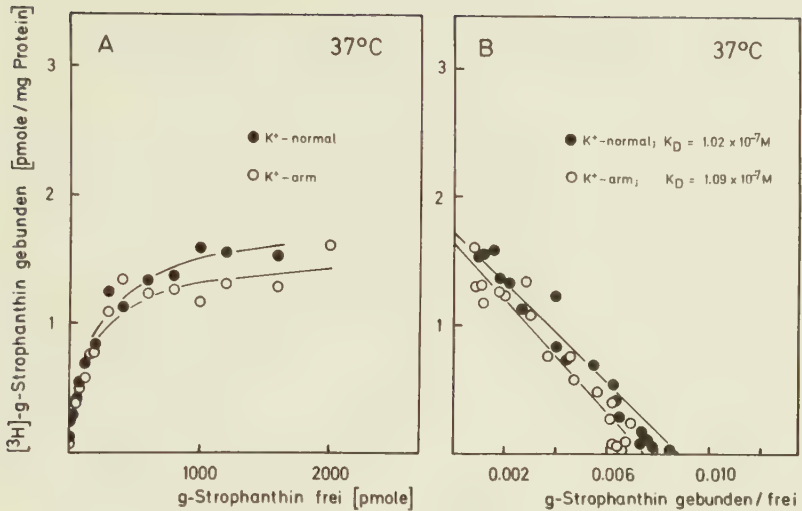


Abb. 28: Einfluß von Hypokaliämie auf die konzentrationsabhängige Bindung von ^3H -g-Strophanthin an linksventrikuläres Herzmuskelhomogenat

Herzmuskelhomogenat aus dem linken Ventrikel eines kaliumarm ernährten Meerschweinchens (0.82 mg Protein; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität 0.018 U/mg Protein) und eines Kontrolltieres (1.51 mg Protein; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität 0.002 U/mg Protein) wurden 120 min. in 50 mM Imidazol/ HCl -Puffer pH 7.25, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 , $4.1 \times 10^{-7} \text{ M}$ ^3H -g-Strophanthin und steigenden Konzentrationen unmarkierten g-Strophanthins bei 37°C inkubiert. Gesamtvolumen 2.0 ml .

	Serumkaliumkonzentration (mval/l)	K_D (M)	BO
$\bullet$ — $\bullet$	5.56	1.02×10^{-7}	1.71×10^{-12}
$\circ$ — $\circ$	3.85	1.09×10^{-7}	1.64×10^{-12}

BO = Anzahl der maximalen Bindungsstellen für den Liganden pro mg Protein

Die Bindungsdaten aus Abb. A sind in B nach Scatchard aufgetragen.

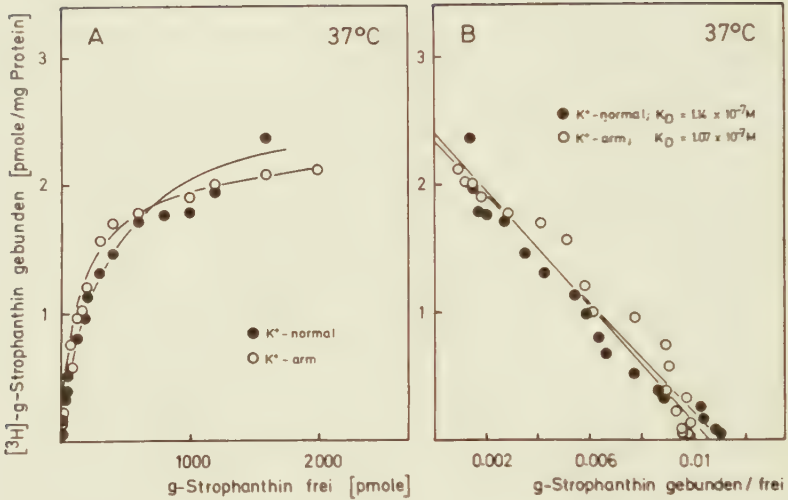


Abb. 29: Einfluß von Hypokaliämie auf die konzentrationsabhängige Bindung von ^3H -g-Strophanthin an rechtsventrikuläres Herzmuskelhomogenat

Herzmuskelhomogenat aus dem rechten Ventrikel eines kaliumarm ernährten Meerschweinchens (0.57 mg Protein; (Na + K)-ATPase-Aktivität 0.002 U/mg Protein) und eines Kontrolltieres (0.56 mg Protein; (Na + K)-ATPase-Aktivität 0.026 U/mg Protein) wurden 120 min. in 50 mM Imidazol/HCl-Puffer pH 7.25, 3 mM MgCl₂, 3 mM Imidazol/PO₄, 4.1 x 10⁻⁷ M ^3H -g-Strophanthin und steigenden Konzentrationen unmarkierten g-Strophanthins bei 37°C inkubiert. Gesamtvolumen 2.0 ml.

	Serumkaliumkonzentration (mval/l)	K _D (M)	B ₀
● — ●	6.25	1.14 x 10 ⁻⁷	2.43 x 10 ⁻¹²
○ — ○	3.85	1.07 x 10 ⁻⁷	2.37 x 10 ⁻¹²

B₀ = Anzahl der maximalen Bindungsstellen für den Liganden pro mg Protein

Die Bindungsdaten aus Abb. A sind in B nach Scatchard aufgetragen.

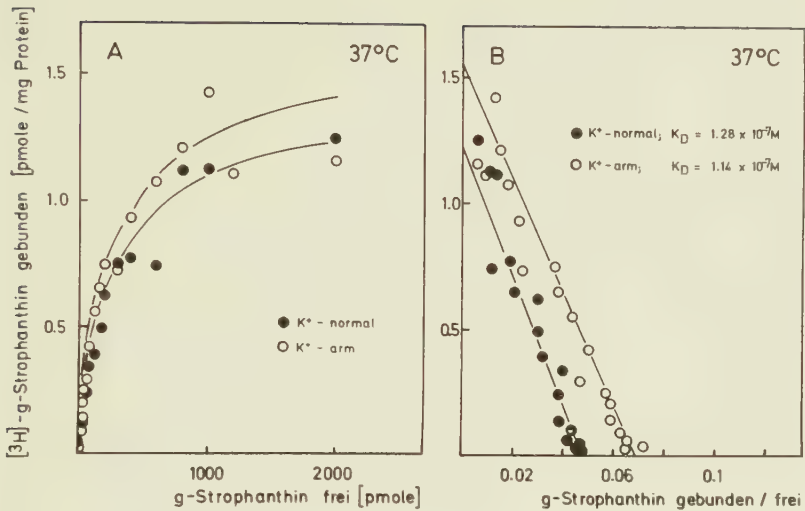


Abb. 30: Einfluß von Hypokaliämie auf die konzentrationsabhängige Bindung von ^3H -g-Strophanthin an linksatriales Herzmuskelhomogenat

Herzmuskelhomogenat aus den linken Vorhöfen von 4 kaliumarm ernährten Meerschweinchen (0.31 mg Protein; $(\text{Na} + \text{K})$ -ATPase-Aktivität 0.002 U/mg Protein) und von 4 Kontrolltieren (0.32 mg Protein; $(\text{Na} + \text{K})$ -ATPase-Aktivität 0.01 U/mg Protein) wurden 120 min. in 50 mM Imidazol/HCl-Puffer pH 7.25, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 , $4.1 \times 10^{-9} \text{ M}$ ^3H -g-Strophanthin und steigenden Konzentrationen unmarkierten g-Strophanthins bei 37°C inkubiert. Gesamtvolumen 2.0 ml .

	Serumkaliumkonzentration (mval/l)	KD (M)	BO
●—●	4.78	1.28×10^{-7}	1.24×10^{-12}
○—○	3.53	1.15×10^{-7}	1.56×10^{-12}

BO = Anzahl der maximalen Bindungsstellen für den Liganden pro mg Protein

Die Bindungsdaten aus Abb. A sind in B nach Scatchard aufgetragen.

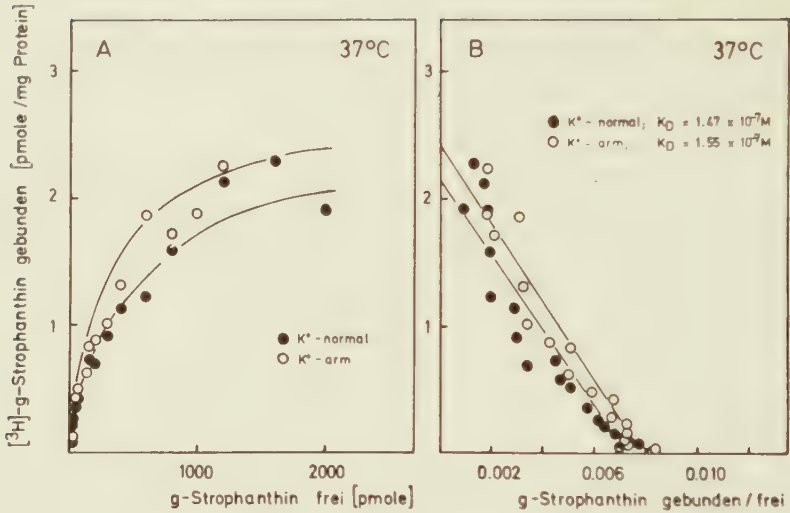


Abb. 31: Einfluß von Hypokaliämie auf die konzentrationsabhängige Bindung von ^3H -g-Strophanthin an rechtsatriales Herzmuskelhomogenat

Herzmuskelhomogenat aus den rechten Vorhöfen von 4 kaliumarm ernährten Meerschweinchen (0.22 mg Protein; $(\text{Na} + \text{K})$ -ATPase-Aktivität 0.041 U/mg Protein) und von 4 Kontrolltieren (0.18 mg Protein; $(\text{Na} + \text{K})$ -ATPase-Aktivität 0.015 U/mg Protein) wurden 120 min. in 50 mM Imidazol/HCl-Puffer pH 7.25, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 , 4.1×10^{-7} M ^3H -g-Strophanthin und steigenden Konzentrationen unmarkierten g-Strophanthins bei 37°C inkubiert. Gesamtvolumen 2.0 ml.

	Serumkaliumkonzentration (mval/l)	KD (M)	BO
●—●	4.78	1.47×10^{-7}	2.15×10^{-12}
○—○	3.53	1.55×10^{-7}	2.44×10^{-12}

BO = Anzahl der maximalen Bindungsstellen für den Liganden pro mg Protein

Die Bindungsdaten aus Abb. A sind in B nach Scatchard aufgetragen.

3.3.4 WIRKUNG VON g-STROPHANTHIN AUF DIE KONTRAKTIONSKRAFT
SCHLAGENDER VORHOF- UND PAPILLARMUSKELN NACH KALIUM-
ARMER DIÄT

An isoliert schlagenden linken Vorhöfen von Meerschweinchen besteht eine enge Korrelation zwischen g-Strophanthinbindung und dem gemessenen positiv inotropen Effekt (33, 35).

Mit diesem Versuchsteil sollte deshalb untersucht werden, bei welchen Herzglykosidkonzentrationen der positiv inotrope Effekt wirksam wird und ob die Konzentrationswirkungskurven durch Hypokaliämie beeinflussbar sind. Sowohl von kaliumarm ernährten Meerschweinchen, als auch von Kontrolltieren wurden linke Vorhöfe und rechtventrikuläre Papillarmuskeln isoliert und deren Kontraktionskraft unter elektrischer Stimulation gemessen (2.7). Die Ergebnisse für Vorhöfe (Abb.32) und Papillarmuskeln (Abb.33) nach kumulativer Herzglykosidzugabe wurden graphisch dargestellt. Eine Verschiebung der Konzentrations-Wirkungskurven für den positiv inotropen Effekt von g-Strophanthin für die kaliumarm ernährten Meerschweinchen war nicht feststellbar.

Dies stimmt mit den Ergebnissen der vorhergehenden Bindungsstudien überein. Hierbei war es zu keiner Änderung der Glykosidrezeptoren am Herzmuskel unter Kaliummangel gekommen. Die g-Strophanthinkonzentrationen, bei denen Arrhythmie oder Kontraktur als Zeichen einer toxischen Dosis auftreten, waren nicht durch die Hypokaliämie beeinflussbar (8×10^{-7} M in linken Vorhöfen, 1×10^{-6} M in Papillarmuskeln).

Aus den S-förmig gekrümmten Konzentrations-Wirkungskurven ergibt sich die halbmaximale Zunahme der Kontraktionskraft bei

einer g-Strophanthin-Konzentration von ca. $3,5 \times 10^{-7}$ M. Sie ist für Vorhöfe und Papillarmuskeln identisch.

Der zeitabhängige Verlauf des g-Strophanthineffektes auf die Kontraktionskraft elektrisch stimuliert schlagender Herzmuskeln ist für linke Vorhöfe (Abb.34) und rechtsventrikuläre Papillarmuskeln (Abb.35) untersucht worden. Für jede g-Strophanthin-Konzentration wurde hierbei ein neuer Muskel verwendet, um Summations- oder Ermüdungseffekte auszuschließen. Jeder Meßpunkt entspricht dem Durchschnittswert von 4 - 7 Experimenten $\pm$ SEM.

Die Kontraktionskraft nimmt ohne Herzglykosid ungefähr um 20 % innerhalb von 30 min. ab. Nach Zugabe von g-Strophanthin nimmt die Kontraktionskraft bis zum Erreichen der toxischen Dosis konzentrationsabhängig zu. Je größer die g-Strophanthin-Konzentration, desto größer und schneller ist die Kontraktionskraftzunahme. Bei einer Konzentration von 1×10^{-6} M ist sie bei Vorhöfen im Vergleich zu Papillarmuskeln mehr als doppelt so groß. Die Ergebnisse der Kontraktionsversuche am Skelettmuskel siehe 4. 3. 3 (Abb. 41)

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die g-Strophanthin-Wirkung auf die Kontraktionskraft schlagender Herzmuskeln nicht durch Kaliummangel verändert wird.

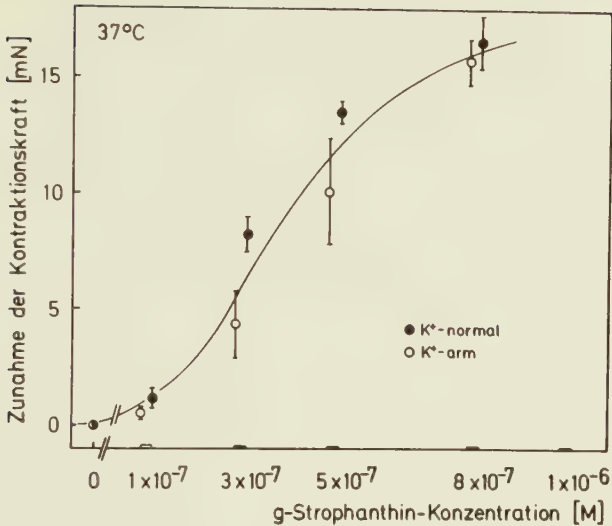


Abb. 32: Einfluß von Hypokaliämie auf die Konzentrations-Wirkungskurve für den positiv inotropen Effekt von g-Strophanthin an Vorhöfen

Die linken Vorhöfe von kaliumarm ernährten Meerschweinchen und Kontrolltieren wurden in einer mit Carbogen begasten Tyrodelösung mit der Frequenz von 1 Hz gereizt. Nach Erreichen eines stabilen Zustandes wurden die verschiedenen g-Strophanthinkonzentrationen kumulativ zugegeben und die Kontraktionskraftzunahmen kontinuierlich 30 min. lang registriert. Jeder Meßpunkt der Kurve entspricht dem Mittelwert aus mindestens 6 Experimenten $\pm$ SEM. Vorhöfe, die Arrhythmie oder Kontraktur zeigten, wurden verworfen. Dies war bei allen g-Strophanthin-Konzentrationen über 1×10^{-6} M der Fall.

Der halbmaximale Effekt wurde bei einer Konzentration von ungefähr 3.5×10^{-7} M gemessen.

Maximale Kontraktionskraftzunahme : 19.03 ± 0.59 (mN)

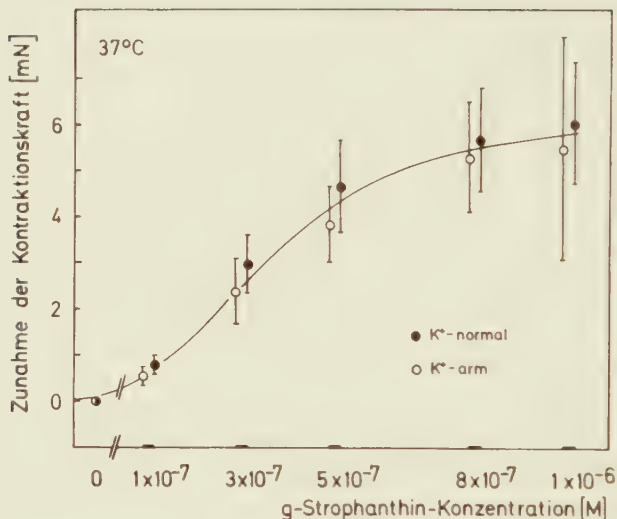


Abb. 33: Einfluß von Hypokaliämie auf die Konzentrations-Wirkungskurve für den positiv inotropen Effekt von g-Strophanthin an Papillarmuskeln

Papillarmuskeln aus den rechten Ventrikeln von kaliumarm ernährten Meerschweinchen und Kontrolltieren wurden in einer Tyrodelösung mit Carbogen begast und unter der kumulativen Zugabe der angegebenen g-Strophanthinkonzentrationen elektrisch gereizt (Frequenz = 1 Hz).

Die Zunahme der Kontraktionskraft wurde kontinuierlich 30 min. lang aufgezeichnet. Jeder Meßpunkt der Kurve ist der Durchschnitt von 6-9 Experimenten $\pm$ SEM. Papillarmuskeln, die arrhythmisch schlugen, wurden verworfen. Alle g-Strophanthin-Konzentrationen über 1×10^{-6} M führten zur Kontraktur. Die Papillarmuskeln von kaliumarm ernährten Tieren zeigten bei einer g-Strophanthin-Konzentration über 1×10^{-6} M häufiger Arrhythmie, als die Kontrollmuskeln. Bei einer Konzentration von ca. 3.5×10^{-7} M g-Strophanthin wurde der halbmaximale Effekt gemessen. Die maximale Kontraktionskraftzunahme betrug 11.11 ± 1.36 (mN).

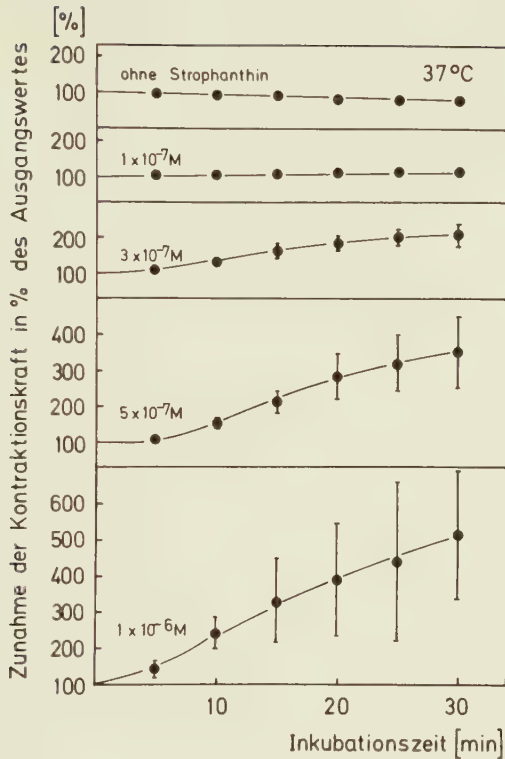


Abb. 34: Zeitabhängiger Verlauf der g-Strophanthinwirkung auf die Kontraktionskraft elektrisch stimuliert schlagender Vorhöfe.

Die linken Vorhöfe von kaliumarm ernährten Meerschweinchen wurden in einer Krebs-Henseleit-Lösung mit Carbogen begast und bei den angegebenen g-Strophanthinkonzentrationen mit einer Frequenz von 1 Hz gereizt. Die Registrierung der Kontraktionskraftänderung erfolgte kontinuierlich. Jeder Vorhof wurde nur für eine Strophanthinkonzentration verwendet und jeder Meßpunkt entspricht dem Durchschnittswert von 4-7 Experimenten $\pm$ SEM. Alle Vorhöfe, die Arrhythmie oder Kontraktur zeigten wurden verworfen.

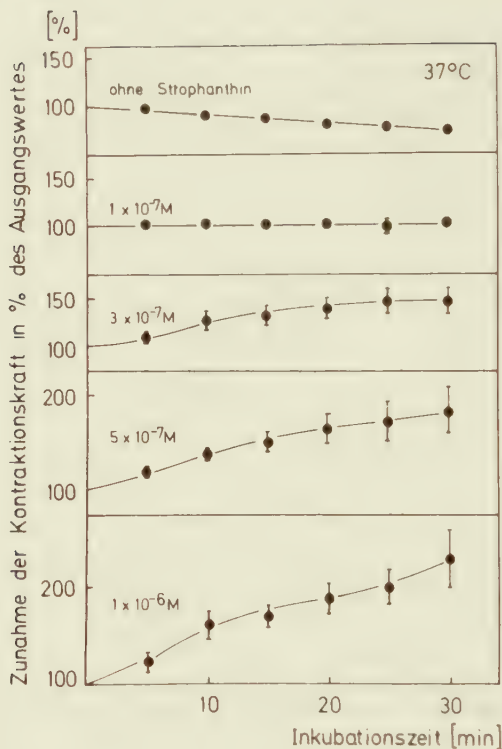


Abb. 35: Zeitabhängiger Verlauf der g-Strophanthinwirkung auf die Kontraktionskraft elektrisch stimuliert schlagender Papillarmuskeln

Papillarmuskeln aus den rechten Ventrikeln von kaliumarm ernährten Meer-schweinchen wurden in einer mit Carbogen begasten Krebs-Henseleit-Lösung bei den angegebenen g-Strophanthin-Konzentrationen mit einer Frequenz von 1 Hz gereizt. Die Registrierung der Kontraktionskraftänderung erfolgte kontinuierlich. Jeder Papillarmuskel wurde nur für eine Strophanthinkonzentration verwendet; jeder Meßpunkt entspricht dem Durchschnittswert von 6-9 Experimenten $\pm$ SEM.

Alle Papillarmuskeln die arrhythmisch schlugen oder Kontraktur zeigten wurden verworfen.

3.3.5 VERRINGERTE HERZGLYKOSIDREZEPTORENDICHTE AM SKELETT- MUSKEL BEI KALIUMMANGEL

Die Zahl der Herzglykosidrezeptoren ist im Skelettmuskel etwa 100 mal größer als am Herzen (93, 191). Er stellt damit das größte Glykosiddepot des Körpers dar (256) und enthält etwa 50 % des Gesamtkörperglykosids (135).

Um die Auswirkungen einer Hypokaliämie auf die Skelettmuskulatur zu untersuchen, wurden Versuche am M. soleus des Meerschweinchens durchgeführt (2.3.2.2). Dieses Organ wird für Experimente an der Skelettmuskulatur, insbesondere bei Ratten häufig verwendet (54, 56, 57, 146, 148, 190, 192, 213).

Aus früheren Untersuchungen an isolierten ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-haltigen Skelettmuskelzellmembranen von Meerschweinchen war bekannt, daß sich bei der zeitabhängigen Bindung kein Äquilibrium einstellt (200). Vielmehr durchläuft die Bindungskapazität ein Maximum bei 30 min. Inkubationszeit und fällt dann kontinuierlich ab. Eine solche Instabilität eines Herzglykosid-Rezeptor-Komplexes findet sich außer am M. soleus des Meerschweinchens nur noch bei Herz- und Skelettmuskeln von Ratten (2, 148, 200).

Skelettmuskelhomogenat (2.3.2.2) hingegen weist ein Äquilibrium nach etwa 60 min. Inkubationszeit auf (Abb.36). Somit ist es möglich, bei Verwendung von Skelettmuskelhomogenat, die Dissoziationskonstante K_D und die Bindungskapazität im Gleichgewichtszustand zu bestimmen. Bei diesem Versuch zur Festlegung der erforderlichen Inkubationszeit wurden einigen

Proben zusätzlich Kalium bis zu einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben. Kalium verringert auch am Skelettmuskel die Glykosid-Rezeptor-Bindung (Abb.37).

Es wurde außerdem ein Kontrollversuch durchgeführt, um sicherzustellen, daß die zeitabhängige Bindung kein Maximum durchläuft. Hierzu wurde der Einfluß der Inkubationszeit auf die konzentrationsabhängige Bindung von ^3H -g-Strophanthin an Skelettmuskelhomogenat untersucht. Homogenat aus dem M. soleus eines normal ernährten Meerschweinchens (0.98 mg Protein; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ -Aktivität 0.005 U/mg Protein) wurde bei 37°C in 50 mM Imidazol/HCl-Puffer pH 7.25, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 , 4.1×10^{-9} M ^3H -g-Strophanthin und steigenden Konzentrationen unmarkierten g-Strophanthins unterschiedlich lang inkubiert. Die Inkubationszeiten für die identische Präparationen waren 30 min. und 120 min. Gesamtvolumen 2.0 ml.

Inkubationszeit (min)	30	120
$K_D \times 10^{-7} \text{ (M)}$	0.34	0.32
$B_D \times 10^{-12}$	0.42	0.40

K_D = Dissoziationskonstante
 B_D = maximale Rezeptormenge

Das Ergebnis zeigt, daß die zeitabhängige Bindung von Skelettmuskelhomogenat im Unterschied zu $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -haltigen Skelettmuskelzellmembranen bei 30 min. kein Maximum durchläuft.

Die Resultate der Bindungsstudien an hypokaliämischen Meerschweinchen sind in Tab. 16 zusammengefaßt.

Tab. 16: Untersuchungen am *M. soleus* nach kaliumarmer Diät.

Nahrung	normal n = 10	kaliumarm n = 15	p
Herzglykosidrezeptoren pro mg Feuchtgewicht $\times 10^{11}$	0.55 ± 0.09	0.34 ± 0.05	0.060
Herzglykosidrezeptoren pro mg Protein $\times 10^{11}$	3.10 ± 0.45	2.72 ± 0.38	0.550
Dissoziationskonstante K_D (M) $\times 10^7$	0.48 ± 0.06	0.54 ± 0.05	0.470
Kaliumkonzentration im Serum (mval/L)	4.79 ± 0.25	3.29 ± 0.20	0.00008
(Na ⁺ +K ⁺)-ATPase- Aktivität (%)	8.87 ± 1.49	14.41 ± 2.70	0.08
(Na ⁺ +K ⁺)-ATPase- Aktivität pro mg Protein (U/mg)	0.005 ± 0.0009	0.029 ± 0.005	0.0001

Ein Experiment wurde graphisch dargestellt (Abb.38)

Die Zahl der Herzglykosidrezeptoren im *M. soleus* betrug bei den normal ernährten Kontrolltieren $0,55 \pm 0.10 \times 10^{+14}$ /g Feuchtgewicht. Sie entspricht damit in etwa der Rezeptorenanzahl die in den Vorhöfen gemessen wurde. Bei den kaliumarm ernährten Meerschweinchen kam es zu einer deutlichen Abnahme der Herzglykosidrezeptoren ($0,34 \pm 0.05 \times 10^{-14}$ /g Feuchtgewicht). Die Zahl der Herzglykosidrezeptoren/g Protein blieb hingegen unverändert ($2,7 \pm 0.4 \times 10^{-14}$). Es zeigte sich ein signifikanter Abfall des Proteinanteils am Gesamtmuskel von 19.2 ± 0.6 % auf 9.2 ± 0.5 %. Da sich das Gesamtprotein stärker verringert als das Feuchtgewicht, kommt es zu einer Abnahme der Proteindichte im Gewebe und damit der Herzglykosidrezeptoren.

Tab. 17: Verhältnis von Proteingehalt und Feuchtgewicht bei Kaliummangel in Ventrikel, Vorhof und M. soleus.

Nahrung	normal	n	kaliumarm	n	
Feuchtgewicht (mg)					
Ventrikel links	630 $\pm$ 39	9	518 $\pm$ 34	7	p=0.040
Ventrikel rechts	370 $\pm$ 23	6	238 $\pm$ 20	7	p=0.001
Vorhof links	199 $\pm$ 31	5	316 $\pm$ 55	5	p=0.106
Vorhof rechts	256 $\pm$ 16	4	239 $\pm$ 42	5	p=0.711
Musculus soleus	648 $\pm$ 30	12	574 $\pm$ 53	20	p=0.238
Gesamtprotein (mg)					
Ventrikel links	69.50 $\pm$ 7.00	9	60.45 $\pm$ 3.78	7	p=0.276
Ventrikel rechts	37.96 $\pm$ 3.87	6	27.30 $\pm$ 1.84	7	p=0.037
Vorhof links	20.75 $\pm$ 1.47	5	26.24 $\pm$ 3.24	5	p=0.174
Vorhof rechts	31.55 $\pm$ 10.04	4	28.84 $\pm$ 5.96	5	p=0.807
Musculus soleus	105.05 $\pm$ 8.85	12	55.45 $\pm$ 6.48	20	p=0.00014
Feuchtgewicht					
Gesamtprotein					
Ventrikel links	9.73 $\pm$ 0.99	9	8.69 $\pm$ 5.67	7	p=0.378
Ventrikel rechts	7.58 $\pm$ 0.80	6	8.74 $\pm$ 0.41	7	p=0.235
Vorhof links	9.49 $\pm$ 1.04	5	11.71 $\pm$ 0.94	5	p=0.148
Vorhof rechts	7.04 $\pm$ 0.99	4	8.94 $\pm$ 1.57	5	p=0.339
Musculus soleus	5.73 $\pm$ 0.19	12	10.84 $\pm$ 0.55	20	p=0.0000

Im Skelettmuskelhomogenat konnte eine einheitliche Rezeptorpopulation nachgewiesen werden (Abb.38). Die Bindung von g-Strophanthin an den Rezeptor erfolgt am Skelettmuskel mit wesentlich höherer Affinität ($K_D = 0.48 \times 10^{-7}$ M) als am Herzen ($K_D = 1.09 \times 10^{-7}$ M). Die Dissoziationskonstante K_D wurde durch den Kaliummangel nicht verändert (Tab.16).

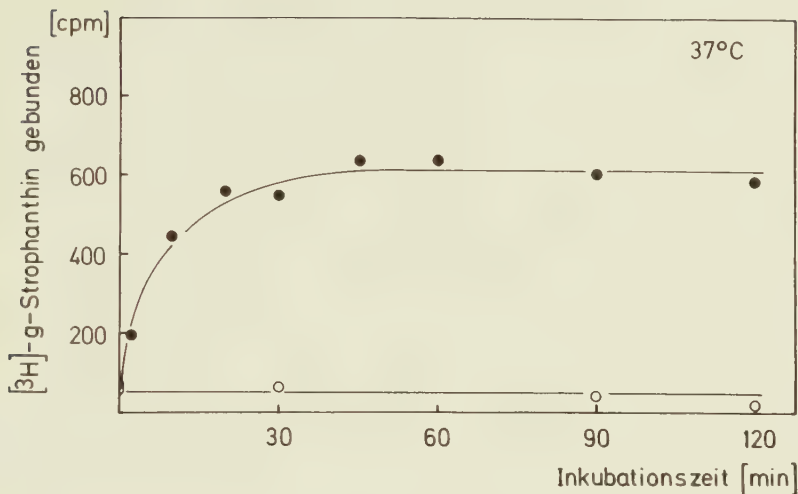


Abb. 36: Zeitabhängige Bindung von ^3H -g-Strophanthin an Skelettmuskelhomogenat des *M. soleus*

Skelettmuskelhomogenat (0.74 mg Protein; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität 0.007 U/mg Protein) wurden in 50 mM Imidazol/HCl-Puffer pH 7.25, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 , $4.1 \times 10^{-4}\text{ M}$ ^3H -g-Strophanthin bei 37°C inkubiert. Gesamtvolumen 2.0 ml .

Das überschüssige, nicht proteingebundene ^3H -g-Strophanthin wurde nach Ablauf der angegebenen Inkubationszeiten über Glasfilter rasch abfiltriert. Die proteingebundene Radioaktivität auf den Glasfiltern wurde gemessen.

- — ● Gesamtbindung von ^3H -g-Strophanthin an Membranen
- — ○ Unspezifische Bindung: ^3H -g-Strophanthinbindung trotz Gegenwart von 10^{-4} M nicht radioaktiv markiertem g-Strophanthin

Definitionsgemäß ist die spezifische Bindung die Differenz zwischen der Gesamtbindung und der unspezifischen Bindung.

Serumkaliumkonzentration: 5.80 mval/L

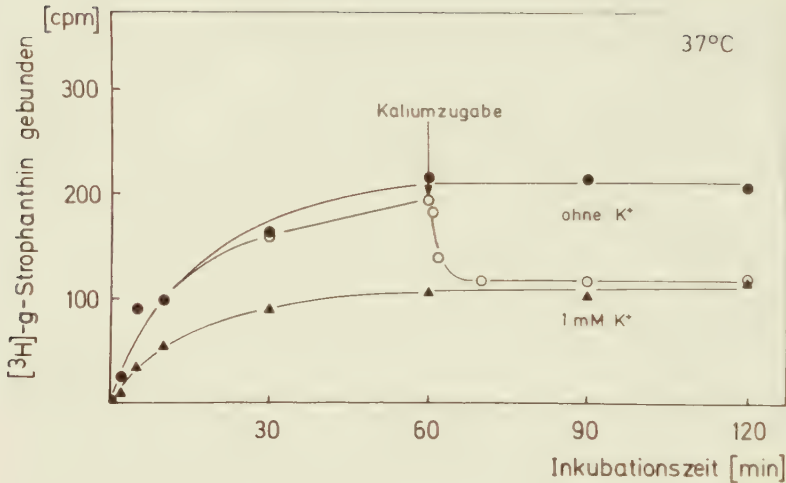


Abb. 37: Kaliumeffekt auf die zeitabhängige Bindung von ^3H -g-Strophanthin an Skelettmuskelhomogenat

Skelettmuskelhomogenat (0.31 mg Protein; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität 0.014 U/mg Protein) wurden in 50 mM Imidazol/HCl-Puffer pH 7.25, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 , 4.1×10^{-9} M ^3H -g-Strophanthin bei 37°C in An- und Abwesenheit einer 1 mM KCl-Lösung inkubiert.

Das überschüssige, nicht proteingebundene ^3H -g-Strophanthin wurde nach Ablauf der angegebenen Inkubationszeiten über Glasfilter rasch abfiltriert. Die proteingebundene Radioaktivität auf den Glasfiltern wurde gemessen.

- — ● Gesamtbindung von ^3H -g-Strophanthin an Membranen als Kontrollkurve ohne Kalium
- — ○ Bindung während der Zugabe einer 1 mM KCl-Lösung
- ▲ — ▲ Bindung bei 1 mM KCl-Lösung im Inkubationsansatz

Bei den Kontrollwerten wurde Magnesiumphosphatpuffer zugegeben.

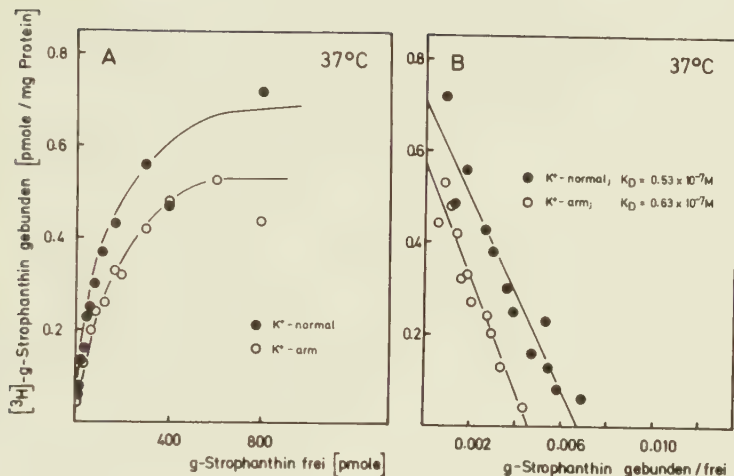


Abb. 38: Einfluß von Hypokaliämie auf die konzentrationsabhängige Bindung von ^3H -g-Strophanthin an Skelettmuskelhomogenat des *M. soleus*

Skelettmuskelhomogenat aus dem *M. soleus* eines kaliumarm ernährten Meer-schweinchens (0.89 mg Protein; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase-Aktivität}$ 0.013 U/mg Protein) und eines Kontrolltieres (0.94 mg Protein; $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase-Aktivität}$ 0.003 U/mg Protein) wurden 120 min. in 50 mM Imidazol/HCl-Puffer pH 7.25, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 , 4.1×10^{-7} M ^3H -g-Strophanthin und steigenden Konzentrationen unmarkierten g-Strophanthins bei 37°C inkubiert. Gesamtvolumen 2.0 ml.

	Serumkaliumkonzentration (mval/l)	KD (M)	B0
●—●	5.31	0.53×10^{-7}	0.71×10^{-12}
○—○	2.24	0.63×10^{-7}	0.58×10^{-12}

B0 = Anzahl der maximalen Bindungsstellen für den Liganden pro mg Protein

Die Bindungsdaten aus Abb. A sind in B nach Scatchard aufgetragen.

3.3.6 ERHÖHTE HERZGLYKOSIDREZEPTORENZAHL IN DER ERYTHROZYTENMEMBRAN DURCH HYPOKALIÄMIE

Eines der ältesten Versuchsmodelle in der Herzglykosidforschung ist der Erythrozyt. Bereits 1953 wurde nachgewiesen, daß Herzglykoside den aktiven Transport von Natrium und Kalium durch die Erythrozytenmembran hemmen (221).

Im chronischen Kaliummangel dagegen ist die $(Na^{+}+K^{+})$ -ATPase-Aktivität in Erythrozytenmembranen erhöht (47). Dieses Ergebnis ist nicht organspezifisch, sondern auch am Herzmuskel nachweisbar (27, 81). Man nimmt an, daß die Herzglykosidrezeptoren in Erythrozyten und Herzmuskelgewebe in ihrer Proteinstruktur identisch sind, weil die Dissoziationskonstante K_D und damit die Affinität in beiden Organen weitgehend übereinstimmen (82, 85).

Bei unseren Versuchen konnten wir eine einheitliche Rezeptorpopulation an der Erythrozytenmembran nachweisen (Abb.39). Es zeigte sich keine Änderung der Affinität (K_D) durch Kaliummangel, aber die Anzahl der Bindungsstellen pro Erythrocyt stieg bei den kaliumarm ernährten Tieren deutlich an (Abb.39, Tab.18)

Tab. 18: Zahl der Herzglykosidrezeptoren an Erythrozyten im Vergleich zur Dissoziationskonstante K_D bei chronischer Hypokaliämie.

Nahrung	normal n = 9	kaliumarm n = 16	
Herzglykosidrezeptoren pro Erythrocyt	510 $\pm$ 70	1040 $\pm$ 120	p=0.00106
Dissoziationskonstante K_D (M) $\times 10^{-7}$	2.03 $\pm$ 0.43	2.18 $\pm$ 0.41	p=0.80289
Kaliumkonzentration im Serum (mval/L)	4.32 $\pm$ 0.42	3.16 $\pm$ 0.24	p=0.05392

Dieses Ergebnis stimmt überein mit der Zunahme der Glykosidrezeptoren an menschlichen Erythrozyten im chronischen Kaliummangel (88, 92).

Bei diesen Untersuchungen war es sogar gelungen, eine Normalisierung der Rezeptorenzahl durch Therapie der Hypokaliämie zu erreichen (91).

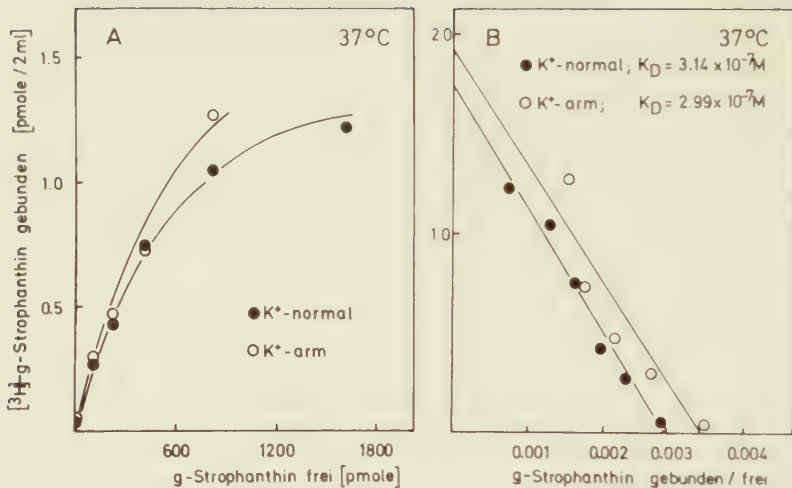


Abb. 39: Einfluß von Hypokaliämie auf die konzentrationsabhängige Bindung von ^3H -g-Strophanthin an Erythrozyten

Mehrfach gewaschene Erythrozyten eines kaliumarm ernährten Meerschweinchens (1.29×10^9 Erythrozyten/ml) und eines Kontrolltieres 1.92×10^9 Erythrozyten/ml wurden 120 min. in 50 mM Imidazol/HCl-Puffer pH 7.25, 3 mM MgCl_2 , 3 mM Imidazol/ PO_4 , $4.1 \times 10^{-6}\text{ M}$ ^3H -g-Strophanthin und steigenden Konzentrationen unmarkierten g-Strophanthins bei 37°C inkubiert. Gesamtvolumen 2.0 ml .

	Ernährung	GR/Erythrozyt	K_D (M)
$\bullet$ — $\bullet$	K^+ -normal	555	0.53×10^{-7}
$\circ$ — $\circ$	K^+ -arm	907	2.99×10^{-7}

GR = Anzahl der Glykosidrezeptoren pro Erythrozyt

Die Bindungsdaten aus Abb. A sind in B nach Scatchard aufgetragen.

4. DISKUSSION

4.1 PATHOPHYSIOLOGIE UND KLINISCHE AUSWIRKUNGEN DES ALLGEMEINEN KALIUMMANGELS

4.1.1 ÄTIOLOGIE

Zu den häufigsten Ursachen eines Kaliummangels zählen Kaliumverluste auf enteralem und renalem Weg (209, 210). Magensaft und Dünndarminhalt haben vergleichsweise hohe Kaliumkonzentrationen. Dies ist ein Faktor für das Entstehen eines Kaliummangelzustandes durch Erbrechen oder chronischen Laxantienabusus. Entscheidend aber für den gastrointestinalen Kaliumverlust sind renale Regulationsmechanismen. Die durch das Erbrechen von saurem Magensaft ausgelöste metabolische Alkalose führt zur Verlagerung von Kaliumionen aus den Extrazellulär- in den Intrazellulär-Raum (42) und zur passiven Sekretion von Kalium aus den Tubuluszellen in das Tubuluslumen (176).

Auch der Einsatz potenter Pharmaka bewirkte eine Zunahme iatrogener Störungen des Wasser- und Elektrolythaushaltes. Diuretika wie Furosemid, Etacrynsäure, Chlortalidon und Thiazidderivate können bei einer Ödemtherapie bereits nach wenigen Tagen zu ausgeprägten Kaliumverlusten führen (222). Lakritzenabusus als Ursache für Kaliummangel ist zwar eine Rarität, aber pathophysiologisch interessant. Die in Lakritzen enthaltene Glycyrrhizinsäure hat mineralokortikoide Eigenschaften (58) und verursacht Hypertonie bzw. eine hypokaliämische Alkalose. Mit diesen Symptomen imitiert der Lakritzenabusus den primären Hyperaldosteronismus (Conn-Syndrom). Eine unzureichende Kaliumzufuhr, wie durch unsere Versuchsbedingungen

provoziert, tritt als Ursache einer Hypokaliämie mit Anorexia nervosa auf.

4.1.2. KALIUMHAUSHALT

Zur Diagnose von Kaliummangel-Zuständen oder Kaliumintoxikationen wird üblicherweise das Serumkalium bestimmt. Der gesamte Kaliumbestand eines gesunden Menschen beträgt durchschnittlich 3500 mval. Davon sind aber nur 2 % extrazellulär und nur 0,4 % ist Serumkalium (222). Dies bedeutet, daß man über Veränderungen des Serumkaliums keine exakten Angaben über Veränderungen im Intrazellularraum erhält, sondern nur indirekt Aussagen über den eigentlichen "Kaliumpool" möglich sind. Ein Abfall der Serum-Kaliumkonzentration um 1 mval/l hat einen Kaliumverlust von etwa 280 mval zur Folge (208).

Nachweislich kann bei normalem Kaliumspiegel ein intrazellulärer Kaliummangel bestehen (78, 243). Deshalb verwendeten wir zusätzlich einen Ganzkörperkaliumzähler. Das intrazelluläre Kalium kann bei dieser Methode in etwa dem Ganzkörperkalium gleichgesetzt werden, weil sich ungefähr 98 % des Kaliums in den Körperzellen befinden, vor allem in der Muskulatur (ca. 3000 mval) (210). Erythrozyten enthalten im Unterschied zum Muskel nur ca. 230 mval Kalium (152). Bei einem gesunden Erwachsenen mit 70 kg Körpergewicht beträgt der durch Ganzkörpermessung errechnete Kaliumbestand etwa 3500 mval bzw. 50 mval/kg Körpergewicht (251). Frauen haben um etwa 20 % niedrigere Werte.

Tierexperimente an Ratten und klinische Untersuchungen zeigen, daß ein durch Mangelernährung induzierter Kaliumverlust haupt-

sächlich aus der Skelettmuskulatur stammt bei annähernd konstantem Kaliumgehalt in Erythrozyten und im Herzmuskel (47, 173, 190). Der Ganzkörperkaliumgehalt (Tab. 11), gemessen als Gammastrahlung der natürlichen ^{40}K -Radioaktivität, zeigte bei Meerschweinchen nach 14-tägiger kaliumarmer Diät eine deutliche Abnahme von etwa 25 %. Die Nettoimpulse reduzierten sich hierbei von 887 (± 36) auf 669 (± 38). Sie wurden pro Tierpaar gemessen, da die Gammastrahlung eines Einzeltieres sich nicht von der Untergrundstrahlung im "Bodycounter" abhebt. Der signifikante Kaliumverlust ist ein Beweis für die Wirksamkeit der kaliumarmen Diät; bei chronischer Hypokaliämie kann das Ganzkörperkalium nämlich auch unverändert sein (261). Die Serumkaliumkonzentration verringert sich unter Kaliummangelbedingungen ebenfalls deutlich von 4.79 (± 0.23 mval/l) auf 3.29 (± 0.21 mval/L), aber nicht so extrem wie in einer früheren Hypokaliämiestudie am Meerschweinchen (81). Damals waren Serumkaliumwerte nach Diät von 2.5 (± 0.4 mval/l) erreicht worden. Ursache für diese Diskrepanz ist möglicherweise die längere Diätdauer von bis zu 18 Tagen bei einem erheblich geringeren Tiergewicht von 200 - 400 g. Unsere Versuchstiere waren im Unterschied dazu mehr als doppelt so schwer (679 $\pm$ 53 g) und wurden nur zwei Wochen einer Mangelernährung zugeführt. Dabei reduzierte sich ihr Ausgangsgewicht um ca. 10 % auf 615 $\pm$ 51 g.

Als Ergebnis der damaligen Untersuchung war in Herzmuskelzellmembranen von Meerschweinchen eine Zunahme der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase Aktivität um 130 % bei ausgeprägter Hypokaliämie gemessen worden (81). An Herzmuskelhomogenaten der selben Spezies

fanden wir eine konstante Anzahl der Herzglykosid-Rezeptoren (Tab. 12, 13, 14, 15) unter den angegebenen, nicht so gravierenden, Hypokaliämiebedingungen (Tab. 10). Dies läßt den Schluß zu, daß bei den erreichten Kaliumkonzentrationen, die Zahl der Digitalisbindungsstellen zumindest gleichbleibt.

4.1.3 SÄURE-BASEN-HAUSHALT

Störungen des Säure-Basen-Haushalts können die Digitalisempfindlichkeit beeinflussen. Da aber in der Regel gleichzeitig Störungen des Kaliumhaushalts auftreten, ist die Beurteilbarkeit eingeschränkt. Klinisch wurden bei Patienten mit chronischen Lungenerkrankungen, insbesondere bei Cor pulmonale und Azidose, bereits bei niedrigen Digitalisspiegeln signifikante Nebenwirkungen, wie Herzrhythmusstörungen festgestellt (72, 126, 188). Experimentell konnte nachgewiesen werden, daß eine Alkalose die Rezeptoraffinität erniedrigt, eine Azidose sie erhöht (95). Weil im Kaliummangel vermehrt Wasserstoffionen über die Nieren ausgeschieden werden, ist mit dem Auftreten einer sog. "paradoxen Azidurie" bzw. metabolischen Alkalose zu rechnen. Deshalb wurde bei den Meerschweinchen durch intrakardiale Punktion des linken Ventrikels, arterialisiertes Blut gewonnen und eine Blutgaskontrolle durchgeführt. Es konnte tatsächlich eine Alkalisierung des Blutes gemessen werden; der pH-Wert war bei den Kontrolltieren 7.35 (± 0.01) und bei den kaliumarm ernährten Meerschweinchen 7.40 (± 0.002) (Tab. 7). Interessanterweise zeigte aber die Blutgasanalyse einen deutlichen Abfall des Kohlensäure-Partialdruckes im arteriellen Blut der Meerschweinchen nach Diät $\text{paco}_2 = 28.61$ (± 4.24 Torr)

im Vergleich zu den Kontrolltieren $\text{paCO}_2 = 34.05$ (± 1.34 Torr). Dieser Befund spricht für eine respiratorische Alkalose durch alveoläre Hyperventilation und gegen die metabolische Alkalose. Auch der negative "base excess" bei einem nahezu unveränderten arteriellen Sauerstoffpartialdruck deutet eher auf einen metabolischen Kompensationsversuch einer respiratorischen Alkalose hin. Unabhängig von der Ursache, könnte aus einer pH-Verschiebung, wie hier durch Kaliummangel induziert, eine Erniedrigung der Rezeptoraffinität für Herzglykoside resultieren (95, 200).

4.1.4 PATHOPHYSIOLOGIE UND SYMPTOME

An Nerven- und Muskelzellen beträgt das Ruhepotential etwa - 85 mV. Es ist eigentlich ein K^+ /Potential, da es nach der Nernstschen Gleichung vor allem durch das Verhältnis von intrazellulärem zu extrazellulärem Kalium bestimmt wird und näherungsweise dem Kaliumgleichgewichtspotential von -97 mV entspricht. Aktionspotentiale können nur dann entstehen, wenn die Schwelle von - 50 mV überschritten wird (74).

Eine akute Senkung der extrazellulären Kaliumkonzentration führt zu einer Negativierung des Membranpotentials (z. B. von - 85 auf - 95 mV) und so zu einer Erhöhung der Schwelle. Dadurch nimmt die Erregbarkeit des neuromuskulären Gewebes ab. Bei extremer Hypokaliämie kommt es zu einem Hyperpolarisationsblock, d. h. die Zelle wird unerregbar (152). Klinisch können Reflexe fehlen, Herzstillstand und schlaffe Lähmungen auftreten.

Chronischer Kaliummangel hingegen kann auch Auswirkungen auf den intrazellulären Kaliumpool haben. Als Adaptionsvorgänge bei chronischer Hypokaliämie wurden beschrieben: eine signifikante Zunahme der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität an Herzmuskelzellmembranen von Meerschweinchen um 40 - 130 % (27, 81) und dementsprechend ein höheres intrazelluläres Kalium bzw. niedrigeres intrazelluläres Natrium als bei akuter Hypokaliämie (246). Der intrazelluläre Kalium-Konzentrationsquotient wird dann nicht so gravierend verändert, wie durch eine akute Senkung der Serum-Kaliumkonzentration und die Funktionsänderungen der Zellmembranen von Herz- und Skelettmuskeln sind geringer, d. h., neuromuskuläre Symptome können fehlen. Elektrophysiologisch nimmt an der Herzmuskelzelle die Anstiegsgeschwindigkeit des Aktionspotentials zu; das Auftreten von Kammertachykardien bei Hypokaliämie wäre damit erklärbar (28, 143).

Die allgemeine Adynamie, Müdigkeit, Muskelschwäche, bis zur schlaffen Parese und Lähmung der Atmungsmuskulatur sind Leitsymptome einer Hypokaliämie. Weitere neuromuskuläre Störungen sind: abgeschwächte Sehnenreflexe und Funktionsstörungen der glatten Muskulatur. Letzteres führt zu Blasenentleerungsstörungen, Wehenschwäche bei Gebärenden und Magen-Darm-Atonie bis hin zum paralytischen Ileus (152, 153, 210). Kardial sind charakteristische EKG-Veränderungen (ST-Senkung, T-Abflachung, U-Wellen), Herzrhythmusstörungen (Extrasystolie, Kammertachykardie) und eine gesteigerte Glykosidempfindlichkeit bei niedrigem Serumkalium nachweisbar.

4.1.5. PHARMAKA UND WIRKUNGSÄNDERUNG

Änderungen der Kaliumkonzentrationen beeinflussen die Wirkung von Herzglykosiden. Das Auftreten digitalisinduzierter Arrhythmien ist unter Hypokaliämiebedingungen bei niedrigeren Digitalisspiegeln beschrieben, als bei normokaliämischen Patienten (167, 231). Bei akuter Hypokaliämie ist die myokardiale Glykosidaufnahme höher als bei Kontrollen (248) und die Bindung von Digitalis an menschliche Herzmuskelzellmembranen nimmt mit abnehmendem extrazellulärem Kaliumwert zu (86). Eine Steigerung der Digitalisempfindlichkeit ist u. a. bei dialysepflichtigen Patienten zu erwarten, bei denen es während der Dialyse zu einem raschen Abfallen der Serum-Kaliumkonzentrationen kommen kann.

Von einer solchen akuten Hypokaliämie ist ein chronischer Kaliummangel abzugrenzen. Chronische Hypokaliämie führt erfahrungsgemäß zu einer relativ besseren Glykosidtoleranz, als eine akute Senkung des Serum-Kaliumspiegels. Laxantienabusus und länger dauernde Diuretikatherapie senken den Kaliumspiegel langsam und das Kaliummangelsyndrom tritt erst zu einem späten Zeitpunkt auf. In klinischen Studien fand man bei Patienten, die mit kaliumeliminierenden Diuretika behandelt wurden, ebenfalls eine Abnahme der Digitalistoleranz (75, 247). In zahlreichen Veröffentlichungen ist eine Abhängigkeit der Digitalisempfindlichkeit vom Alter beschrieben. Säuglinge und Kleinkinder tolerieren anscheinend höhere Digitalisdosen pro Gewichtseinheit als Erwachsene (244). Eine Erklärung für diesen Befund könnte eine Zunahme der Herzglykosidrezeptoren sein. An

Erythrozyten von Neugeborenen konnte dies bereits nachgewiesen werden (143).

Umgekehrt scheint die Situation bei Patienten über 65 Jahren zu sein. Bei ihnen kommt es trotz Digoxindosen im normalen therapeutischen Bereich häufiger zu Intoxikationen (69, 186). Ursache hierfür ist wahrscheinlich eine Abnahme des Verteilungsraumes für Digitalis mit zunehmendem Lebensalter. Sowohl die Zahl von Glykosidrezeptoren im Herzen (204), als auch die Muskelmasse (69), sind bei älteren Patienten erniedrigt. In tierexperimentellen Untersuchungen an Meerschweinchen wurde ebenfalls eine Altersabhängigkeit der Anzahl von Bindungsstellen für ^3H -g-Strophanthin nachgewiesen. Eine signifikante Abnahme der Glykosidrezeptoren in Skelettmuskeln konnte nur innerhalb der ersten Lebenswoche gefunden werden. Anschließend blieb deren Zahl pro g Feuchtgewicht bis zur 32. Woche weitestgehend konstant (147). Deshalb wurden von uns, um das Lebensalter als Einflußgröße auszuschalten, ausschließlich 24-32 Wochen alte Meerschweinchen verwendet. Wenn die Digitalisempfindlichkeit erhöht ist (Änderungen der Serumelektrolyte, pH-Wert, u. a.) oder der Digitalisspiegel durch Änderung der Pharmakokinetik (Beeinflussung von Aufnahme, Verteilungsraum, Plasmaeiweißbindung) ansteigt, so kann es bereits bei normalen Digitalisdosen zu Nebenwirkungen kommen. Die Häufigkeit von Digitalis-Intoxikationen bei hospitalisierten Patienten schwankt zwischen 4 - 35 % (20, 103, 239, 241). An kardialen Auswirkungen einer Digitalisvergiftung sterben durchschnittlich 11 % der Patienten (214, 215). Häufigstes Symptom einer Glykosidintoxikation sind Herzrhythmusstörungen, die in

über 90 % der Fälle bei intoxikierten Patienten auftreten (11). Gastrointestinale Symptome, wie Übelkeit und Erbrechen, wurden bei 12 - 18 % der Patienten gefunden (69) und sind deshalb ein relativ unzuverlässiges diagnostisches Kriterium. Der diagnostische Stellenwert von neurologischen Symptomen, wie z. B. Gelbsehen, kann durch Anwendung einer speziellen Prüfanordnung erhöht werden (212).

4.2 DER HERZGLYKOSID-REZEPTOR

4.2.1 EIGENSCHAFTEN

Die Bindungsstellen für Digitalismoleküle sind an der Außenseite der Zellmembran lokalisiert (136, 218, 237), eng mit dem Transportenzym ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase verknüpft (6, 236) und weisen folgende Eigenschaften eines Rezeptors auf:

- Die Herzglykoside werden selektiv gebunden und hemmen spezifisch die ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase (61, 114, 221, 228).
- Die Pharmakon-Rezeptorbindung ist reversibel, da z. B. nach erfolgter ^3H -g-Strophanthin-Rezeptorbindung durch Zugabe von Kalium ins Inkubationsmedium die Menge an membrangebundenem Herzglykosid reduziert werden kann (Abb. 27, 37).
- Die Bindungsstellen für Herzglykoside sind hitzelabil, weil sich an hitzedenaturierten inaktiven Membranen kein ^3H -g-Strophanthin spezifisch bindet (91).
- Der Verlauf der Bindungskurven von ^3H -g-Strophanthin an isolierten Zellmembranen zeigt, daß der Digitalisrezeptor zeit- und temperaturabhängige Bindungseigenschaften aufweist; siehe zeitabhängige Bindung (Abb. 12), Dissoziations-

konstante (Abb. 15, 17), Assoziations- und Dissoziationsrate (Abb. 13, 14).

- Erhöht man sukzessive die Herzglykosidkonzentration im Inkubationsmedium, binden die Zellmembranen bis alle Rezeptoren besetzt sind. Die reversible Bindungsreaktion ist demnach konzentrationsabhängig, folgt einer Sättigungskinetik und entspricht unter Gleichgewichtsbedingungen dem Massenwirkungsgesetz (Abb. 25, 30).
- Die spezifische Membranbindung der Herzglykoside bewirkt an elektrisch gereizt schlagenden Vorhof- und Papillarmuskeln von Meerschweinchen eine Zunahme der Kontraktionskraft, sie ist also mit einem pharmakologischen Effekt gekoppelt (Abb. 32, 33)

4.2.2 UNTERSUCHUNGSMETHODEN

Forschungsergebnisse über den Wirkungsmechanismus der Herzglykoside wurden nicht nur an unterschiedlichen Spezies, wie Mensch (88, 102, 217, 224), Huhn (144, 259), Ratte (144, 190), Kaninchen (253) und Meerschweinchen (27, 81), sondern auch mit verschiedenartigen Untersuchungsmethoden an Zellmembranen (27, 81, 253), Homogenaten (190), Zellkulturen (144, 202, 259) und isolierten Präparaten (33, 35, 93) gewonnen. Jedes Verfahren bietet spezifische Vorteile für die Aufklärung der Reaktionskette, die von der Herzglykosidbindung zum pharmakologischen Effekt führt.

In spontan schlagenden, kultivierten Herzmuskelzellen sind Auswirkungen pathophysiologischer Zustände auf die Herzglykosidwirkung simulierbar unter direkter Kontrolle der Pharmako-

dynamik (258). Elektrisch stimuliert schlagende Herzmuskelpräparate, wie Vorhof- und Papillarmuskeln ermöglichen eine qualitative Beurteilung des positiv inotropen Effekts (Abb. 32, 33, 34, 35). Für eine quantitative Betrachtungsweise der Herzglykosid-Rezeptorbindung finden Gewebshomogenate Verwendung (Tab. 12, 13, 14, 15, 16) (95). Isolierte Zellmembranen wiederum sind geeigneter für Analysen der Rezeptorkinetik (Tab. 2, 3, 4) und Thermodynamik (Tab. 5, 6), da eine hohe ATPase-Aktivität durch Anreicherung erreicht wird, so daß der Einfluß der unspezifischen Bindung verhältnismäßig gering und die Hemmung der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase exakt meßbar ist. Zur genaueren Charakterisierung der Herzglykosid-Rezeptorbindung untersuchten wir deshalb isolierte ATPase-haltige Herzmuskelzellmembranen von Meerschweinchen.

4.2.3 BINDUNGSKINETIK

Die spezifische Bindung von g-Strophanthin an Membranpräparationen von Herzmuskelzellen ist ein zeitabhängiger Prozeß (Abb. 12, 27), der einer konzentrationsabhängigen Sättigungskinetik folgt. Bereits nach 5 min. war der Gleichgewichtszustand des ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes erreicht; er blieb bei einer Inkubationstemperatur von 37°C über mindestens zwei Stunden konstant. Menschliche Herzmuskelzellmembranen benötigen im Unterschied dazu mindestens 90 min. bis zum Erreichen des Äquilibriums bei einer Stabilität von mindestens 6 Stunden (206) und Erythrozyten von Meerschweinchen ungefähr 30 min. (200).

An Skelettmuskelzellmembranen von Meerschweinchen folgt die zeitabhängige Bindung von ^3H -g-Strophanthin nicht der erwarteten Sättigungskinetik, sondern sie nimmt nach einem initialen Maximum wieder ab (200). Dieses Phänomen findet sich sonst nur noch an Skelett- und Herzmuskeln von Ratten und erschwert z. B. eine exakte Bestimmung der Dissoziationskonstante K_D , da sich der Herzglykosid-Rezeptor-Komplex nicht im Gleichgewichtszustand befindet. Ursächlich muß berücksichtigt werden, daß Isolierung der Zellmembranen gleichbedeutend ist mit Verlust der Zellintegrität. Durch die Membranpräparation werden die Zellen unphysiologisch behandelt. Ihre Membranproteine können durch Ladungsverschiebung instabil oder bei einer Präparation mit Desoxycholat herausgelöst werden und so ist eine Veränderung der Tertiär- oder Quartärstruktur nicht ausgeschlossen.

Aus unseren Untersuchungen geht hervor, daß die Pharmakon-Rezeptorbindung an Skelettmuskelhomogenaten einen stabilen Gleichgewichtszustand erreicht und die erforderliche Sättigungskinetik aufweist (Abb. 36).

4. 2. 4 THERMODYNAMIK

Herzmuskelzellmembranen bestehen aus einer Phospholipiddoppelschicht (233,234). Als Herzglykosidrezeptor fungiert ein Proteinmolekül, das die Herzmuskelzellmembran durchspannt und eng mit der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) \text{-ATPase}$ verknüpft ist. Die Aktivität dieses Enzymsystems, welches verantwortlich ist für den aktiven Na^+ / K^+ -Transport durch die Zellmembran, wird u. a. beeinflusst von der Lipiddynamik der Doppelschicht (65). Nach Erreichen

einer bestimmten kritischen Temperatur sind Auswirkungen auf die Bindungseigenschaften membrangebundener Rezeptoren meßbar. Bei Auftragung der Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten (k_{-1}) als Funktion der Temperatur nach Arrhenius zeigt sich in der Assoziationskurve ein Knick (Abb. 16 A). Dieser Umschlagspunkt, gemessen an Herzmuskelzellmembranen von Meerschweinchen liegt im Bereich von $20 - 10^{\circ}\text{C}$, wobei eine exakte Definition der kritischen Temperatur mit den von uns ermittelten Meßpunkten nicht möglich ist. Ein Knick in der Arrheniusauftragung der Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten (k_{+1}) konnte u. a. auch am Herzmuskel und Hirngewebe des Menschen bei 21°C nachgewiesen werden (204). Ebenso zeigte sich dieses Phänomen in den Aktivitätskurven der $(\text{Na}^{+} + \text{K}^{+})\text{-ATPase}$ bei 18°C an Kaninchennieren (101), bei 23°C an menschlichen Herzmuskelzellen (65) und bei 25°C am Rinderhirn (49). Sowohl die Bindungseigenschaften von Rezeptoren, als auch Enzymaktivitäten können demnach bei Erreichen der kritischen Temperatur beeinflusst werden. Als Ursache dieser eingeschränkten Reaktionsfähigkeit wird eine Konformationsänderung der Membranproteine aufgrund temperaturabhängiger Phasenverschiebungen in der Lipidmatrix diskutiert (134, 219). Nach Behandlung der Zellmembranen mit Phospholipase (A, C) oder Detergentien (Natriumdesoxycholat) resultiert wieder ein linearer Verlauf der Arrheniusauftragung (49, 249).

Die thermodynamischen Eigenschaften der g-Strophanthin-Rezeptorbindung an isolierten Herzmuskelzellmembranen sind im Gleichgewichtszustand speziesabhängig. Sie sind bei Meerschweinchen, Rind und Hund ähnlich (82), unterscheiden sich

aber von den in Nieren von Meerschweinchen gemessenen Konstanten.

Die freie Energie ΔG^0 beträgt bei Herzmuskelzellen von Meerschweinchen etwa 10 kcal/mol, Rind 11 kcal/mol und Mensch 12 kcal/mol (82, 204).

Die Herzglykosidbindung ist demnach ein exergonischer Prozeß und erfolgt mit hoher Affinität (255), wobei am menschlichen Herzen bei geeigneter Versuchsanordnung die größte Arbeit erbracht werden könnte. Die Änderung der freien Energie im Gleichgewichtszustand nimmt am Herzmuskel des Meerschweinchens mit steigender Inkubationstemperatur (10-37°C) um insgesamt 0.44 kcal/mol zu (Tab. 5). Dieser mäßige Anstieg korreliert gut mit der Änderung der Affinitätskonstanten $K_A = 1/K_D$ in Abhängigkeit von der Temperatur (Abb. 16 B). Die Standardenthalpie (ΔH^0) des Systems wurde aus der Van't-Hoff-Auftragung (Abb. 17) berechnet und beträgt am Meerschweinchen-Herzmuskel 4,8 kcal/mol (Tab. 5), im Unterschied zu menschlichen Herzmuskelzellen, bei denen erheblich mehr Wärme frei wird (13.7 Kcal/mol) (204).

Die Änderung der freien Energie im Übergangszustand ΔG^+ = +11.5 kcal/mol (Tab. 6) liegt im positiven Bereich und ist damit ein Hinweis auf eine Energiebarriere (255). Die Aktivierungsenergie E_A , als Maß für die Reaktionsfähigkeit, ist im Temperaturbereich 20 - 37°C konstant bei 8.86 kcal/mol, bei Temperaturen zwischen 10 und 20°C aber mit 19.6 kcal/mol stark erhöht. Diese eingeschränkte Reaktionsfähigkeit bei kritischen Temperaturen wird bei graphischer Darstellung der thermodynamischen Konstanten in Energieprofilen besonders deutlich.

(Abb. 18, 19). Sie entspricht dem Knick in der Arrheniusauftragung der Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{+1} (Abb. 16) bei gleichem Temperaturbereich und untermauert die Theorie der temperaturabhängigen Phasenverschiebung innerhalb der Herzmuskelzellmembranen. In der Gelphase ist somit zur Überwindung des Energieberges eine größere Aktivierungsenergie erforderlich.

An den Herzmuskelzellmembranen von Meerschweinchen wurden erheblich schnellere Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten gemessen, als bei den Tierspezies höherer Digitalisempfindlichkeit (36).

Die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{+1} von Meerschweinchen beträgt bei 37°C $5.28 \times 10^4 \text{ (M}^{-1}\text{sec}^{-1}\text{)}$ und nimmt mit sinkender Inkubationstemperatur ab (Tab. 2). Im Vergleich hierzu erfolgt die Bindung an Herzmuskelzellmembranen von Mensch und Katze $k_{+1} = 1.2 \times 10^5 \text{ (M}^{-1}\text{sec}^{-1}\text{)}$, bzw. Rind $k_{+1} = 1.0 \times 10^5 \text{ (M}^{-1}\text{sec}^{-1}\text{)}$ schneller (36). Ebenso wie die Bindung von $^3\text{H-g-Strophanthin}$ an den Rezeptor, zeigt auch die Abdissoziation aus dem Liganden-Rezeptorkomplex eine zeit-, temperatur- und tierspeziesabhängige Kinetik (Tab. 4). Bei 37°C beträgt k_{-1} beim Meerschweinchen $9.39 \times 10^{-3} \text{ (sec}^{-1}\text{)}$ und die Geschwindigkeit der Abdissoziation vom g-Strophanthin-Rezeptorkomplex ist somit größer, als bei Mensch $k_{-1} = 2.3 \times 10^{-4} \text{ (sec}^{-1}\text{)}$, Katze $k_{-1} = 1.9 \times 10^{-4} \text{ (sec}^{-1}\text{)}$ und Rind $k_{-1} = 1.2 \times 10^{-4} \text{ (sec}^{-1}\text{)}$. Sinkende Temperaturen verringern auch die Dissoziationsgeschwindigkeit (Tab. 3) im untersuchten Bereich von 37 - 4°C.

Die Dissoziationskonstante K_D , die sich u. a. aus dem Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten k_{-1}/k_{+1} errechnen läßt, ist beim Meerschweinchen mit 1.78×10^{-7} (M) deutlich größer als bei Mensch 1.9×10^{-9} (M), Katze 1.6×10^{-9} (M) und Rind 1.2×10^{-9} (M) (Tab. 4/27).

Der Mensch hat demnach eine schnellere Herzglykosidbindung an den Rezeptor und auch eine langsamere Abdissoziation des Liganden als Meerschweinchen. Die Kontaktzeit zwischen Herzglykosid und Rezeptor ist bei ihm also verlängert, die Bindungsaffinität und die Digitalisempfindlichkeit erhöht.

Ebenso wie die Geschwindigkeitskonstanten (k_{-1}/k_{+1}), ist die Dissoziationskonstante K_D abhängig von Inkubationsdauer und -temperatur (Abb. 15). K_D gilt als Maß für die Affinität zwischen Ligand und Rezeptor; je kleiner die Dissoziationskonstante, desto größer die Affinität. Aus Tabelle 4 ist ersichtlich, daß bei Abnahme der Inkubationstemperatur die Affinität zwischen ^3H -g-Strophanthin und Herzmuskelzellmembranen zunimmt.

Die Dissoziationskonstante K_D der Herzmuskelzellmembran von Meerschweinchen wurde mit drei unterschiedlichen Verfahren ermittelt, um die Zuverlässigkeit der einzelnen Methoden zu kontrollieren. Eine direkte Bestimmung ermöglicht die Durchführung einer konzentrationsabhängigen Bindung von g-Strophanthin an Membranpräparationen und Auftragung der so gewonnenen Bindungsdaten nach Scatchard (3.1.5). Die erhaltene Gerade spricht für einen einheitlichen Rezeptortyp und aus dem Anstieg wurde der Wert der Dissoziationskonstante bei 37°C errechnet: $K_D = 1.13 \times 10^{-7}$ (M) (Tab. 4).

Als Alternativverfahren zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten (K_D) bietet sich die sog. Verdrängungsmethode nach Erdmann und Schoner an (84) (3.1.5). Die hiermit gefundenen Ergebnisse bestätigen die Scatchard-Methode in ihrer Aussagekraft. Bei 37°C wurde hiermit folgender Wert gemessen:
 $K_D = 1.36 \times 10^{-7} \text{ (M)}$ (Tab. 4).

Wie bereits erwähnt, läßt sich die Dissoziationskonstante auch noch aus dem Quotienten der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten (k_{-1}) und der Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten (k_{+1}) errechnen: $K_D = k_{-1}/k_{+1} = 1.78 \times 10^{-7} \text{ (M)}$. Die mit den unterschiedlichen experimentellen Methoden gefundenen Zahlenwerte für die Dissoziationskonstante (K_D) sprechen für die Präzision der angewandten Verfahren. Auch im Vergleich zu den Ergebnissen früherer Untersuchungen (91, 200) an Herzmuskelzellmembranen von Meerschweinchen ($K_D = 1.8 \times 10^{-7}$ bzw. $1.98 \times 10^{-7} \text{ (M)}$) zeigt sich eine weitgehende Übereinstimmung. Bei niedriger Inkubationstemperatur ist die Differenz noch geringer (Tab. 4).

Ein Vergleich mit den Dissoziationskonstanten digitalisempfindlicher Tierspezies, wie Schaf ($K_D = 1.1 \times 10^{-9} \text{ (M)}$), Rind ($K_D = 2.7 \times 10^{-9} \text{ (M)}$), Mensch ($K_D = 3.7 \times 10^{-9} \text{ (M)}$), und Katze ($K_D = 4.2 \times 10^{-9} \text{ (M)}$) zeigt, daß die Affinität für $^3\text{H-g-Strophanthin}$ an isolierten ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-haltigen Herzmuskelzellmembranen von Meerschweinchen 30 - 50 mal geringer ist (36, 37, 260). Nur Rattenherzen sind noch unempfindlicher (93). Die Dissoziationskonstante der $^3\text{H-g-Strophanthin}$ -Bindung an Meerschweinchenherzen $K_D = 1.13 \times 10^{-7} \text{ (M)}$ zeigt eine weitgehende Übereinstimmung mit den in kultivierten Herzmus-

kelzellen $K_D = 1.5 \times 10^{-7}$ (M) und in Herzmuskelzellmembranen $K_D = 4.3 \times 10^{-7}$ (M) von Hühnerembryonen gemessenen Werten (258, 260).

Die Dissoziationskonstante ist nicht nur von der Tierspezies, sondern auch vom untersuchten Organ abhängig. Wichtig ist, daß die Bindung zwischen g-Strophanthin und dem Rezeptor in Übereinstimmung mit den Ergebnissen ($K_D = 0.43 \times 10^{-7}$ (M)) früherer Untersuchungen (91, 200) am Skelettmuskel die höchste Affinität aufweist: $K_D = 0.48 \times 10^{-7}$ (M) (Tab. 16). Die größte Dissoziationskonstante und damit die geringste Affinität haben wir beim Meerschweinchen (Tab. 18) an den Erythrozyten gemessen $K_D = 2.03 \times 10^{-7}$ (M).

Die Bindungsaffinität des Herzmuskels liegt zwischen diesen beiden Extremwerten (Tab. 4). Entsprechend dem Ergebnis am M. soleus, war am Diaphragma von Meerschweinchen eine Herzglykosidbindungsstelle mit einer acht mal höheren Affinität gefunden worden, als am linken Ventrikel (16).

Überraschenderweise stimmt die Dissoziationskonstante von Meerschweinchenskelettmuskeln, die durch Verwendung von Homogenat (Tab. 16) bestimmt wurde $K_D = 0.48 \times 10^{-7}$ (M) weitgehend mit den Ergebnissen überein, die an isolierten Zellmembranen (87) gefunden wurden ($K_D = 0.62 \times 10^{-7}$ (M)), obwohl sie eine unterschiedliche Sättigungskinetik aufweisen. Die Vermutung liegt nahe, daß die bei Skelettmuskel-zellmembranen selbständig einsetzende Dissoziation des g-Strophanthin-Rezeptorkomplexes durch die Membranpräparation bedingt ist, die möglicherweise zu einer Schädigung der Zell-

membran führt und bestimmte Eigenschaften, wie z. B. die zeitabhängige Bindung, verändert (200).

Isolierte Herzmuskelzellmembranen von Meerschweinchen sind zwar auch nur durch Zerstörung der Zellen erhältlich, aber die Veränderungen sind anscheinend nicht so ausgeprägt, wie am Skelettmuskel. Die zeitabhängige Bindung am Herzmuskel folgt bei beiden Präparationsmethoden einer Sättigungskinetik und die Dissoziationskonstanten von Herzmuskelhomogenat ($K_D = 1.09 \times 10^{-7} \text{ (M)}$) und $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -haltigen Herzmuskelzellmembranen ($K_D = 1.13 \times 10^{-7} \text{ (M)}$) sind nahezu identisch.

Neuere Untersuchungen an Rattenherzen weisen auf die Existenz zweier unterschiedlicher Klassen von Herzglykosidrezeptoren hin, die sich in ihrer Bindungsaffinität unterscheiden (93, 115, 116, 258). Eine höher affine Rezeptorart ($K_D = 1.05 \times 10^{-7} \text{ M}$) mit geringer Bindungskapazität (ca. 15% der Bindungsstellen) und eine niederaffine Rezeptorart ($K_D = 2.8 \times 10^{-5} \text{ (M)}$) mit hoher Bindungskapazität (ca. 85% der Rezeptoren) (93). Es wird angenommen, daß mit der Glykosidbindung an den hochaffinen Rezeptor die Zunahme der Kontraktionskraft verknüpft ist, während für die Hemmung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ und das Auslösen von toxischen Effekten, wie z. B. Arrhythmien, die niederaffinen Rezeptoren bei entsprechend höheren Glykosidkonzentrationen abgesättigt werden müssen (33, 65, 101, 258). Mit unseren Untersuchungsmethoden läßt sich nur die hochaffine Bindungsstelle charakterisieren. Durch Experimente mit kultivierten Herzmuskelzellen von Ratten (258), aber auch beim Meerschweinchen (116) konnte jedoch nachgewiesen werden, daß bei diesen relativ digitalis-

unempfindlichen Spezies zwei verschiedenartige g-Strophanthin-Bindungsstellen vorhanden sind (38). Sollte dies auch für den Menschen zutreffen, wäre die Entwicklung eines Medikaments, welches selektiv an die hochaffinen Herzglykosid-Rezeptoren bindet von besonderem klinischen Interesse.

4.2.5 KALIUMEINFLUSS

Inkubiert man Herzmuskelzellmembranen von Meerschweinchen mit einer 2 mM Kaliumlösung, verringert sich die Menge des rezeptorgebundenen g-Strophanthins und der Gleichgewichtszustand wird erst nach 10 min. erreicht (Abb. 12, 17). Der antagonistische Einfluß von Kalium auf die Pharmakon-Rezeptor-Bindung wird besonders deutlich, wenn man zum vorher gebundenen ^3H -g-Strophanthin Kalium zufügt (Abb. 27). Die Menge des membrangebundenen Herzglykosids nimmt dadurch sowohl am Herz- als auch am Skelettmuskel ab (Abb. 37).

Kalium erniedrigt konzentrationsabhängig, wahrscheinlich über eine Konformationsänderung der Bindungsproteine (8, 83), die Affinität des Rezeptors für Herzglykoside, wie dies für Strophanthin u. a. an Herzmuskelzellmembranen von Meerschweinchen (Abb. 26, 27) und für Digoxin an menschlichen myokardialen Zellmembranen nachgewiesen werden kann (5).

Lediglich die Assoziationsgeschwindigkeit wird hierbei verlangsamt (Abb. 22), Bindungskapazität (Abb. 24) und Dissoziationsgeschwindigkeit (Abb. 23) bleiben unverändert (86). Bei einer Kaliumkonzentration von 1 mM verringert sich die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{+1} von $5.71 \times 10^4 \text{ (M}^{-1} \text{ sec}^{-1})$ auf $1,78 \times 10^4 \text{ (M}^{-1} \text{ sec}^{-1})$ bei einer unveränderten Dis-

soziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1} von 6.4×10^{-3} (sec^{-1}). Dies muß Auswirkungen auf die Dissoziationskonstante $K_D = k_{-1}/k_{+1}$ haben. In Gegenwart einer 1 mM Kaliumlösung stieg die Dissoziationskonstante von 1.29×10^{-7} (M) auf 4.38×10^{-7} (M), d. h., die Affinität des Glykosidrezeptors am Meerschweinchenherzen sinkt um den Faktor 3.5 (Abb. 24). Ein ähnliches Verhalten wurde auch an menschlichen Herzmuskelzellmembranen nachgewiesen, wobei eine Kaliumkonzentration von 5 mM Kalium erforderlich war, um die Affinität der g-Strophanthin-Rezeptor-Bindung um den Faktor 10 herabzusetzen (91).

Die sukzessive Zugabe von Kalium zum Inkubationsmedium führt demnach zu einer deutlichen Abnahme der Glykosidbindung (Abb. 20) und die halbmaximale Hemmkonzentration I_{50} wurde unter Gleichgewichtsbedingungen bei 0.5 mM Kalium bestimmt (Abb. 21). Insbesondere bei leichteren Glykosidintoxikationen mit tachykarden Herzrhythmusstörungen kann die Infusion von Kaliumsalzen als therapeutische Maßnahme indiziert sein, zumal sie auch an den Purkinjefasern, also direkt am Reizleitungssystem, die Rezeptorbindung von ^3H -g-Strophanthin reduziert (6). Da Kalium die AV-Knoten-Refraktätszeit verlängert (104), sind vorhandene AV-Überleitungsstörungen eine relative Kontraindikation für eine Kaliumgabe (178). Ebenso ist Zurückhaltung geboten bei Vergiftungen mit extremen Digitalisdosen, da es hierbei zum Auftreten von therapierefraktären Hyperkaliämien kommen kann (24).

4. 3 HYPOKALIÄMIE UND PHARMAKODYNAMIK

Die Pharmakodynamik der Herzglykoside bei Hypokaliämie kann theoretisch beeinflusst werden durch eine Änderung der

- **Affinität** der Herzglykosid-Rezeptoren
- **Aktivität** der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase
- **Zahl** der Herzglykosidrezeptoren (258)

4. 3. 1 BINDUNGSEIGENSCHAFTEN IM SUBAKUTEN KALIUMMANGEL

Bei Untersuchungen des allgemeinen Kaliummangels ist eine Differenzierung von akuten und chronischen Kaliummangelzuständen sinnvoll.

In klinischen Studien u. a. an über 230 Patienten mit Serumkaliumkonzentrationen zwischen 3.6 und 1.5 mval/L, überwiegend aufgrund chronischer Diuretikatherapie, wurde eine Abnahme der intrazellulären Kaliumkonzentration bei erhöhtem Natriumgehalt nachgewiesen (13, 60), wobei als Ursache eine Hemmung des aktiven Na^+/K^+ -Transports anzusehen ist. Im Unterschied hierzu konnte an Erythrozyten von Ratten trotz einer bis zu 8 Wochen dauernden kaliumarmen Diät und einer extrem niedrigen Serumkaliumkonzentration von 1.7 mmol/L keine Änderung des Na^+/K^+ -Gehalts erzielt werden (148). Eine Definition unserer Versuchsbedingungen als chronischer Kaliummangel wäre deshalb nicht exakt.

Andererseits ist bei dialysepflichtigen Patienten mit akuter Hypokaliämie keine zahlenmäßige Veränderung der Herzglykosid-Rezeptoren pro Erythrozyt feststellbar (91), im Gegensatz zur Zunahme der Glykosidbindungsstellen, die wir an den Erythro-

zyten unserer Versuchstiere nachweisen konnten (Tab. 18). Aus diesen Gründen ist eine Bezeichnung des Kaliummangelzustands unserer Versuchstiere als subakute Hypokaliämie am geeignetsten, obwohl die Meerschweinchen einer 14-tägigen strengen kaliumarmen Diät ausgesetzt wurden.

Einen Überblick über die bisherigen Veröffentlichungen zum Thema "Hypokaliämie und Herzglykosidrezeptoren" vermittelt Tabelle 19.

Tabelle 19: Änderungen der Herzglykosidrezeptoren bei Hypokaliämie

Organ	Spezies	Meßgröße	Veränderung	Literatur
Herzmuskel- zellmembranen	Kaninchen	g-Strophanthin- Bindung	+ 50 %	(253)
	Meerschweinchen	(Na ⁺ +K ⁺)-ATPase- Aktivität	+ 130 %	(103)
			+ 41 %	(104)
Herzmuskel- zellkulturen	Hühner	g-Strophanthin- Bindung	+ 25 % (Muskel)	(10)
			+ 66 % (Bindegew.)	(10)
			+ 60 %	(185)
HeLa- zellkulturen	Mensch	g-Strophanthin- Bindung	+ 100 %	(217)
Skelettmuskel- biopsien	Ratte	g-Strophanthin- Bindung	- 38 % (1 Woche)	(65)
			- 78 % (3 Wochen)	(65)
Skelettmuskel- zellmembranen	Kaninchen	g-Strophanthin- Bindung	konstant	(150)
Erythrozyten	Mensch	g-Strophanthin- Bindung	+ 103 %	(66)
			+ 37 %	(183)
			+ 30 %	(154)
			+ 110 %	(218)
	Ratte	(Na ⁺ +K ⁺)-ATPase- Aktivität	+ 75 %	(102)

Sie zeigt, daß Reaktionen auf Hypokaliämie spezies- und organ-
abhängig sind und eine Erniedrigung der extrazellulären Kali-
umkonzentration mit Veränderungen der Aktivität, aber auch der
Anzahl der Pumpmoleküle beantwortet werden. Die Ergebnisse

wurden an verschiedenartigsten Spezies gewonnen, was einen Vergleich der einzelnen Organgewebe erschwert. Unsere Gewebeeruntersuchungen wurden deshalb ausschließlich am Meerschweinchen durchgeführt und es zeigte sich, daß subakute Hypokaliämie bei einer durchschnittlichen Kaliumkonzentrationssenkung von 1.5 mval/L (Tab. 10) nicht die Affinität für g-Strophanthin in Erythrozyten (Abb. 39) oder Muskelhomogenaten (Abb. 28, 29, 30, 31, 37) verändert. Vorhöfe und Ventrikel haben also auch nach Kaliummangelernährung identische Dissoziationskonstanten und die Bindung von g-Strophanthin an den Rezeptor erfolgt in den vier Herzhöhlen, ebenso wie am M. soleus, mit gleichbleibender Affinität. Diese Konstanz entspricht den Ergebnissen anderer Untersucher, unabhängig davon, ob sie an Homogenaten (112) oder Zellmembranpräparationen (27, 81) gewonnen wurden. Die Unterschiede in den Dissoziationskonstanten von Blutkörperchen, Herz- und Skelettmuskulatur führen auch bei Meerschweinchen mit kaliumarmer Diät zu folgender Affinitätseinstufung: Die höchste Affinität für Herzglykoside besitzt der M. soleus $K_D = 0.54 \times 10^{-7}$ M vor den Herzmuskelhomogenaten $K_D = 1.05 \times 10^{-7}$ M und den Erythrozyten $K_D = 2.18 \times 10^{-7}$ M (Tab. 12, 13, 14, 15, 16, 18).

In einer klinischen Studie blieb die Dissoziationskonstante der Herzglykosid-Rezeptor-Bindung an Erythrozyten sowohl bei Patienten mit chronischem Kaliummangel $K_D = 2.59 \times 10^{-9}$ M, als auch bei Dialysepatienten mit akutem Kaliumabfall $K_D = 2.90 \times 10^{-9}$ M konstant (91). Der intrazelluläre Na^+ - und K^+ -Gehalt lag bei beiden Patientengruppen im Normbereich.

Dialysepflichtige Patienten, bei denen im Rahmen einer Dialyse ein akuter Kaliumkonzentrationsabfall von 2 mval/l auftreten kann, sind aber empfindlicher gegenüber Glykosiden, als Patienten nach einer langdauernden Diuretikatherapie und chronischer Hypokaliämie (100). Dies bedeutet, daß es andere Mechanismen geben muß (z. B. Änderung der Zahl und Aktivität von Pumpmolekülen) die Rezeptoreigenschaften bei Kaliummangel beeinflussen können.

4.3.2 REZEPTORDICHTE UND AKTIVITÄT

Hypokaliämie und Herzglykoside führen zu einer Hemmung des aktiven Na^+/K^+ -Transports (258). Als Kompensationsmechanismen sind eine Aktivitätssteigerung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase und eine Zunahme der Anzahl von Herzglykosid-Rezeptoren in Erwägung zu ziehen. Eine Abnahme der Rezeptorenzahl läßt den Analogieschluß zu, daß hierdurch die Empfindlichkeit gegenüber Herzglykosiden erhöht ist. Unsere Rezeptorstudien dokumentieren, daß sich die untersuchten Gewebe in der Anzahl ihrer Bindungsstellen für Herzglykoside, als Reaktion auf einen Kaliummangelzustand unterscheiden:

- Zunahme bei Erythrozyten
- keine Veränderung am Herzmuskel
- Abnahme im M. soleus

Die Ergebnisse der bisherigen Publikationen zur Frage der Rezeptordichte in Abhängigkeit von Spezies und Organ zeigt Tabelle 20.

Tabelle 20: Herzglykosid-Rezeptordichte bei verschiedenen Spezies

Spezies	Organ	Rezeptor- ₂ dichte/um	Typ	Literatur
Mensch	Linker Ventrikel	1000	Homogenat	(91, 95)
Meerschweinchen	Linker Vorhof	530	Homogenat	(33)
		430	hochaffin	(33)
		18000	niederaffin	(33)
		540		(44)
		300		(115)
Huhn	Papillarmuskel	800		(174)
	Herzmuskelzellen	430	Kultur	(260)
	Herzbindegewebszellen	300	Kultur	(260)
Katze	Ventrikel	760		(185)
Ratte	Ventrikelstreifen	660		(93)
Frosch	Herzzellen	720	Kultur	(181)
	Skelettmuskel	660		(177)

Nur bei 5 - 32 Wochen alten Tieren ist die Gewähr für eine Konstanz der g-Strophanthin-Bindungsstellen am M. soleus gegeben, weshalb wir nur Meerschweinchen mit entsprechendem Lebensalter untersuchten (146, 147). Bei unseren normal ernährten Meerschweinchen der Kontrollgruppe sind zwischen Vorhöfen und Kammern des Herzmuskels Unterschiede in der Anzahl der Bindungsstellen feststellbar. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen früherer Untersuchungen an Meerschweinchen (264) ist die Rezeptorzahl für g-Strophanthin an linken (0.69×10^{11} /mg Feuchtgewicht) und rechten Vorhöfen (0.66×10^{11} /mg Feuchtgewicht) erheblich geringer, als z. B. im rechten Ventrikel (1.67×10^{11} /mg Feuchtgewicht) (Tab. 12, 13, 14, 15). Die von Yamamoto et al. gemessene Bindungskapazität war im rechten Ventrikel (5.66 pmol/mg Protein) ebenfalls deutlich höher, als im linken Vorhof (3.46 pmol/mg Protein) (264). Auch an menschlichen Herzmuskelhomogenaten ist eine unterschiedliche Anzahl von Bindungsstellen in den einzelnen Herzzräumen nachweisbar (91, 94, 98). Es wurden ca. 1.5×10^{14}

Rezeptoren/g Feuchtgewicht im linken Ventrikel und nur 0.6×10^{14} Rezeptoren/g Feuchtgewicht in den Vorhöfen gemessen. Im Herzmuskel der Meerschweinchen war auch nach 14-tägiger kaliumarmer Diät die Zahl der Rezeptoren in den Vorhöfen nur etwa halb so groß, wie in den Ventrikeln. Sie blieb trotz Hypokaliämie konstant, wobei kein gravierender Unterschied zwischen linker und rechter Herzseite feststellbar war (Tab. 11, 12, 13, 14, 15). Als Ergebnis bleibt festzuhalten, daß in Herzmuskelhomogenaten von Meerschweinchen sich weder die Dissoziationskonstante K_D , noch die Anzahl der Glykosidbindungsstellen im subakuten Kaliummangel verändern.

Im Unterschied hierzu steht das Verhalten des Skelettmuskels bei Hypokaliämie. In den von uns untersuchten M.-soleus-Homogenaten war zwar die Zahl der Herzglykosid-Rezeptoren der normal ernährten Kontrolltiere 0.15 (bzw. 0.55×10^{11} /mg Feuchtgewicht) in etwa identisch mit den in Vorhöfen ermittelten Rezeptorzahlen, aber bei Kaliummangeldiät nahm diese Zahl deutlich ab 0.10 (bzw. 0.34×10^{11} /mg Feuchtgewicht) (41) (Tab. 16). Auch andere Forschungsgruppen konnten eine Veränderung der Bindungskapazität für g-Strophanthin im Skelettmuskel von Ratten nachweisen, mit einer Abnahme von bis zu 78 % nach 3-wöchiger Hypokaliämie (144, 190).

Allerdings existieren auch Untersuchungen, die teilweise zu abweichenden Ergebnissen geführt haben (Tab. 19). Beispielsweise schwanken hierbei die Angaben über die Bindungskapazität zwischen unverändert am Skelettmuskel und ansteigend am Herzmuskel (253). Ebenso wurde im Unterschied zu unseren Ergebnissen eine Zunahme der $(Na^+ + K^+) - ATPase$ -Aktivität zwischen 41 %

und 130 % an Herzmuskeln von Meerschweinchen bzw. Kaninchen festgestellt (27, 81, 253).

Diese Diskrepanz ist wahrscheinlich auf die Anwendung verschiedenartiger Präparationsmethoden zurückzuführen. Die abweichenden Studien (27, 81, 253) wurden alle an isolierten Herzmuskelzellmembranen durchgeführt, wobei die Zellen aus ihrem physiologischen Zellverband herausgerissen wurden. Eine Interpretation von Versuchsergebnissen an isolierten Zellmembranen muß daher vorsichtig und kritisch erfolgen (200). So konnte z. B. nachgewiesen werden, daß Vanadat die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase in intakten Zellen stimuliert, aus isolierten Zellmembranen aber hemmt (257).

Bei den Untersuchungen von Nørgaard et al. (144, 190) wurde Muskelhomogenat verwendet, wie auch bei unseren Studien (40, 41).

Als weiteres Resultat konnten wir an Muskelhomogenaten eine Konstanz der Bindungsaffinität unter Hypokaliämiebedingungen nachweisen, d.h., sie bleibt am Skelettmuskel ($K_D = 0.48 \times 10^{-7} \text{ M}$) höher als am Herzmuskel ($K_D = 1.09 \times 10^{-7} \text{ M}$). Diese hohe Affinität des Meerschweinchen-Skelettmuskels für g-Strophanthin und die Abnahme seiner Bindungsstellen bei Hypokaliämie legen die Vermutung nahe, daß er einen anderen Rezeptor für Herzglykoside besitzt, als der Herzmuskel. Das unterschiedliche Rezeptorverhalten in Herz- und Skelettmuskel steht in einer engen Korrelation mit dem Kaliumverhalten in diesen Gewebearten nach 2-4-wöchiger Hypokaliämie (123, 190). Bei Kaninchen wurde nachgewiesen, daß chronischer Kaliummangel den Kaliumgehalt in Skelettmuskeln um 25 % reduzierte, ohne am Herzen einen intrazellulären Kaliumverlust zu bewirken (46, 253).

Eine Zunahme der Bindungsstellen für Herzglykoside konnte auch an Zellkulturen von Hühnerherzmuskelzellen in einem kalium-armen Nährmedium nachgewiesen werden (144, 258, 259), aber nur bei sehr niedrigen Kaliumkonzentrationen (ca. 1 mM K⁺). Sie liegen damit unter den im Tierversuch erreichbaren Serumwerten und sind normalerweise mit dem Leben nicht vereinbar.

Die zwei am genauesten in Bezug auf Herzglykosid-Rezeptoren untersuchten Organe Erythrozyt (wohl wegen seiner leichten Gewinnung) und Herz (wegen des primär kardialen Angriffspunkts von Digitalis) zeigen gravierende Unterschiede in der Anzahl der Bindungsstellen (Tab. 21).

Tabelle 21: Herzglykosid-Bindungsstellen an Erythrozyten und Herz

Organ	Spezies	Bindungsstellen/ Zelle	Typ	Literatur
Erythrozyt	Mensch	200		(76)
		650		(18)
		1200		(110)
		450		(161)
		260		(92)
		450	Hypertonie	(92)
		670	Thalassaemie	(92)
		810	Bartter Sndrom	(92)
		510	chronische	(88)
		440	Hypokaliämie	(102)
		400	Morbus Crohn	(224)
Herz	Ratte	1600x10 ³	Muskelzellkultur	(181)
		147x10 ³	Muskelzellkultur	(108)
		80x10 ³	hochaffin	(258)
		1000x10 ³	niederaffin	(258)
		33x10 ³	Bindegewebszellkulturen	(108)
	Huhn	540x10 ³	Muskelzellkultur	(1)
		860x10 ³	Muskelzellkultur	(260)
		150x10 ³	hochaffin	(142)
		1400x10 ³	niederaffin	(142)
		300x10 ³	Bindegewebszellkulturen	(260)
	Kaninchen	8500x10 ³	Kardiozytensuspension	(73)
	Hund	740x10 ³	Kardiozytensuspension	(197)

Die Rezeptoren an den Erythrozyten von Meerschweinchen unterscheiden sich auch in ihrem Verhalten gegenüber Kaliummangel von den Herzmuskelzellen. Infolge der 2-wöchigen kaliumarmen Diät kam es zu einem Konzentrationsabfall des Serumkaliums von 4.32 auf 3.16 mval/L und zu einer Verdoppelung der Herzglykosid-Rezeptoren von 420 (bzw. 510 ± 70) auf 1029 (bzw. 1040 ± 110) pro Erythrozyt (41) (Tab. 18).

Dieses Ergebnis stimmt überein mit den Rezeptorveränderungen, die man an menschlichen Erythrozyten hypokaliämischer Patienten gefunden hat. Die Kontrollgruppe wies einen Serumkaliumwert von 4.5 mval/L und 259 ± 60 Rezeptoren pro Erythrozyt auf, im Unterschied zu den Hypokaliämiepatienten, bei denen ein Serumkalium von 3.0 mval/L und eine signifikante Zunahme der Rezeptoren auf 512 ± 131 pro Erythrozyt gefunden wurden (92). Unsere Untersuchungen an Meerschweinchen wurden bei einer Kaliumkonzentration zwischen 2.5 und 3.5 mval/L durchgeführt, weil die Werte der meisten Patienten mit Hypokaliämie in diesem Meßbereich liegen (162). Der nunmehr von mehreren Autoren nachgewiesene Kompensationsmechanismus der Erythrozyten mit einer Zunahme der Bindungsstellen zwischen 30 % - 115 % (Tab. 19), tritt nur bei chronischem bzw. subakutem Kaliummangel auf. Akute Hypokaliämie hingegen, z. B. bei dialysepflichtigen Patienten, ist ohne Auswirkung auf die Rezeptordichte (91).

Erythrozyten von Meerschweinchen ($K_D = 2.18 \times 10^{-7} M$) und menschliche Erythrozyten ($K_D = 2.60 \times 10^{-9} M$) ändern bei Hypokaliämie nicht ihre Dissoziationskonstanten (Tab. 18) (88).

Im chronischen Kaliummangel ist sowohl an den Erythrozyten von Ratten (47), wie auch am Herzmuskel von Meerschweinchen (27,

81) eine signifikante Steigerung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität beschrieben worden. Unter den von uns simulierten Kaliummangelbedingungen mit einem Serumkaliumabfall von 4.8 auf 3.3 mval/L (Tab. 10), blieb aber die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität weitgehend konstant (Tab. 12, 13, 14, 15). Als Gründe hierfür sind verschiedenartige Präparationsmethoden, abweichende Hypokaliämiebedingungen und unterschiedliches Körpergewicht der Versuchstiere zu nennen. So erreichten z. B. die Meerschweinchen an deren Herzmuskelgewebe ein Anstieg der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität von bis zu 130 % nach 18-tägiger Diät nachgewiesen wurde, Serumkaliumwerte von 2.5 mval/L; außerdem war deren Körpergewicht nur halb so groß, wie das unserer Versuchstiere. Im übrigen muß einschränkend gesagt werden, daß Untersuchungen zur Überprüfung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität an Zellmembranpräparationen (27, 81) geeigneter sind, als an Muskelhomogenaten, da an Zellmembranen die erreichbare spezifische Aktivität höher ist. Festzuhalten bleibt, daß die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Aktivität an den von uns untersuchten Herz- und Skelettmuskelhomogenaten von Meerschweinchen bei subakuter Hypokaliämie zumindest gleichgeblieben ist.

Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, daß die kinetischen Konstanten (k_{+1} , k_{-1} , K_D) in menschlichen Erythrozyten und im Herzen weitgehend identisch sind (85). Es wurde deshalb vermutet, daß das als Rezeptor fungierende Molekül aufgrund gleicher Eigenschaften in beiden Organen identisch ist. Unsere Untersuchungen an Meerschweinchen zeigen jedoch, daß die Antwort des Erythrozyten auf Hypokaliämie anders ausfällt, als

die des Herz- und Skelettmuskels. Obwohl sich Erythrozyten wegen ihrer leichten Gewinnung und Zugänglichkeit für Untersuchungen anbieten, sind sie kein geeignetes Modell, das Rezeptorstudien an anderen Organen ersetzen könnte. Gestützt wird diese Ansicht auch durch die Ergebnisse von Werdan et al. (259). In Zellkulturen von Hühnerherzzellen wurden die nicht kontraktionsfähigen Bindegewebszellen und die sich spontan kontrahierenden eigentlichen Herzmuskelzellen getrennt untersucht. Wie bei menschlichen Erythrozyten (109), korreliert zwar die Hemmung der aktiven $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme, und damit der intrazelluläre Na^+ - und K^+ -Gehalt, direkt mit der Glykosidbindung, aber nur in den Bindegewebszellen. Herzmuskelzellen und Erythrozyten weisen jedoch unterschiedliche Glykosidwirkungen auf.

4. 3. 3 AUSWIRKUNGEN AUF DEN PHARMAKOLOGISCHEN EFFEKT

Unsere Bindungsstudien an Meerschweinchen belegen, daß bei Hypokaliämie die Zahl der Herzglykosid-Rezeptoren am Herzmuskel konstant bleibt, trotz eindeutiger Abnahme am Skelettmuskel. Die Frage liegt nahe, ob dieses unterschiedliche Organverhalten nur Auswirkungen auf die Toxizität oder auch auf den positiv inotropen Effekt der Herzglykoside hat. Versuche an Ventrikelstreifen von Ratten (93), linken Vorhöfen von Meerschweinchen (33), Katzenpapillarmuskeln (185) und Schafspurkinjefäden (39, 163) haben gezeigt, daß an elektrisch gereizt schlagenden Herzmuskeln die g-Strophanthin-Bindung eng mit dem positiv inotropen Effekt verknüpft ist. Die Glykosidbindungskurven verhielten sich kongruent zur Kontraktions-

kraftzunahme bei positiv inotropen Herzglykosidkonzentrationen. Aufgrund dieser Korrelation ist zu vermuten, daß jede Änderung der Rezeptorenanzahl auch die Konzentrations-Wirkungskurve von g-Strophanthin beeinflussen müßte, wie in Zellkulturen von Hühnerherzzellen nachweisbar ist (144, 259). Hierbei wurde aufgrund chronischer Hypokaliämie an kultivierten Herzmuskelzellen von Hühnerembryonen eine Zunahme der Herzglykosidrezeptoren gemessen, die zu einer Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve führte (259). Wir untersuchten deshalb Herz (linke Vorhöfe und rechtsventrikuläre Papillarmuskeln) und Skelettmuskel (M. soleus) auf Änderung ihrer Kontraktionskraft, sowohl von kaliumarm ernährten Meerschweinchen, als auch von Kontrolltieren. Die nahezu identischen Konzentrations-Wirkungskurven von normo- und hypo-kaliämischen Meerschweinchen (Abb. 40) sind ein weiterer Hinweis darauf, daß sich weder die Anzahl der Bindungsstellen, noch deren Affinität für g-Strophanthin an elektrisch gereizt schlagenden Herzmuskeln unter Hypokaliämie signifikant verändern.

Die g-Strophanthin-Konzentration, bei der eine halbmaximale Zunahme des positiv inotropen Effekts gemessen wurde, ist für Vorhöfe und Papillarmuskeln identisch und beträgt $3.5 \times 10^{-7} \text{ M}$ bei einer Toxizitätsschwelle von $1 \times 10^{-6} \text{ M}$. Aber die maximale Kontraktionskraftzunahme nach g-Strophanthingabe ist an Vorhöfen mit $16.9 \pm 1.14 \text{ mN}$ ($19.03 \pm 0.59 \text{ mN}$) deutlich größer, als an den Papillarmuskeln 6.64 ± 1.21 (bzw. $11.1 \pm 1.36 \text{ mN}$) (41) (Abb. 32, 33). Dies stimmt überein mit den Ergebnissen von Yamamoto et al., der ebenfalls an

Papillarmuskeln einen geringeren positiv inotropen Effekt nachweisen konnte, als an den Vorhöfen und Ventrikeln von Meerschweinchen (267).

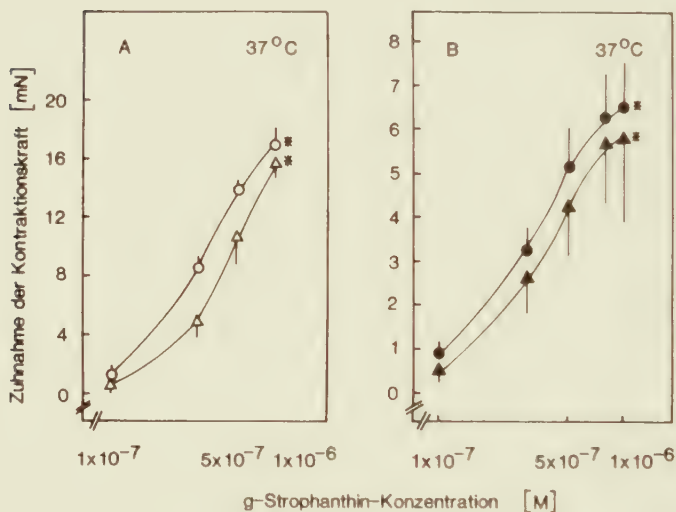


Abb. 40:

Konzentrations-Wirkungskurven für den positiv inotropen Effekt von g-Strophanthin an linken Vorhöfen (A) und rechtsventrikulären Papillarmuskeln bei (B) normo- und hypokaliämischen Meerschweinchen.

- Normalkost Vorhof
- △ Normalkost Papillarmuskel
- kaliumarme Diät Vorhof
- ▲ kaliumarme Diät Papillarmuskel
- * Konzentration ab der Anzeichen für toxische Wirkung auftreten

Im Unterschied zu den Ergebnissen von Hall et al., der an narkotisierten hypokaliämischen Hunden nach Digoxininfusionen eine Abnahme des positiv inotropen Effekts festgestellt hat (111, 122), blieb die maximale Kontraktionskraftzunahme an

elektrisch stimuliert schlagenden Meerschweinchenherzen durch unsere hypokaliämische Diät konstant (Abb. 32, 33, 40). Die chronische Hypokaliämie der Hunde mit Serumkaliumwerten von ca. 2.9 mval/L wurde durch eine doppelt so lange Kaliummangel-diät, wie bei unseren Versuchstieren und die zusätzliche Gabe von Furosemid erzeugt (122). Dies ist ein wichtiger Unterschied in der Methodik im Vergleich zu unseren Experimenten. Auch an Skelettmuskeln von Ratten war nur durch die zusätzliche Gabe von Fluorohydrocortison ein intrazellulärer Kaliumverlust und Natriumanstieg nachweisbar (148). Eine kaliumarme Diät ohne Diuretikazusatz führte hierbei zu keinen signifikanten Elektrolytveränderungen und somit nicht zu einer chronischen Hypokaliämie. Dementsprechend zeigte eine akutere Hypokaliämie, vergleichbar unseren Versuchsbedingungen und provoziert durch Infusionen von Glucose und Insulin, auch am Hund keine Veränderung des positiv inotropen Effekts durch Digoxin (111).

Am M. soleus von Meerschweinchen konnten wir trotz der Abnahme der Bindungskapazität für Herzglykoside nach kaliumarmer Diät keine hypokaliämiebedingten Unterschiede im Kontraktionsverhalten der isoliert schlagenden Skelettmuskelstreifen nachweisen (Abb. 41).

Nach Zugabe von 1×10^{-6} M g-Strophanthin zeigten sich an den Skelettmuskelpräparaten negativ inotrope Effekte, wie sie von früheren Untersuchungen bekannt sind (64). Niedrigere Herzglykosid-Konzentrationen waren entweder wirkungslos, oder führten etwas langsamer zu dem negativ inotropen Effekt, der auch nach 30 min. noch keinen stabilen Zustand erreicht hatte

(Abb. 41). Dieses identische Verhalten der Skelettmuskelstreifen von normo- und hypokaliämischen Meerschweinchen läßt den Schluß zu, daß Hypokaliämie am M. soleus überwiegend die Rezeptorenanzahl beeinflusst, wahrscheinlich unabhängig von der $(Na^+ + K^+)$ -ATPase. Die Konzentrations-Wirkungskurve wird hierbei nicht verschoben.

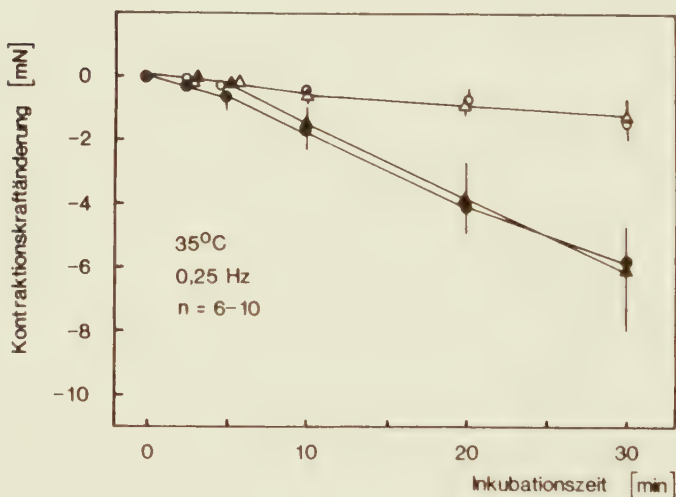


Abb. 41:

Wirkung von g-Strophanthin auf elektrisch stimuliert schlagende Skelettmuskelstreifen des M. soleus von normo- und hypokaliämischen Meerschweinchen.

- | | |
|-----------------|---|
| ○ Normokaliämie | Kontrollgruppe |
| ● Normokaliämie | g-Strophanthin ($1 \times 10^{-6} M$) |
| △ Hypokaliämie | Kontrollgruppe |
| ▲ Hypokaliämie | g-Strophanthin ($1 \times 10^{-6} M$) |

4.3.4 MECHANISMUS DER GESTEIGERTEN DIGITALISEMPFINDLICHKEIT BEI HYPOKALIÄMIE

Es ist noch ungeklärt, ob die Ergebnisse, die an den Meerschweinchen gewonnen wurden, auf den Menschen übertragbar sind. Möglicherweise haben nämlich seine Skelettmuskeln eine geringere Affinität für g-Strophanthin, als der menschliche Herzmuskel (67, 194). Unabhängig davon scheint mir das Verhalten der Gesamtbindungskapazität des Skelettmuskels und seine Auswirkungen auf die Rezeptoren im Herzmuskel von entscheidender Bedeutung, da sich der weitaus größte Teil der Herzglykosidbindungsstellen des menschliche Körpers in der Skelettmuskulatur befindet (194). Kürzlich wurde eine Methode entwickelt, die es erlaubt, die Gesamtzahl an Herzglykosidrezeptoren aus Skelettmuskelbiopsien von Menschen zu bestimmen (193). Da eine verminderte Ansprechbarkeit auf Digitalispräparate bei Hyperthyreose schon lange bekannt ist (117, 129), wurden Patienten mit einer Schilddrüsendysfunktion auf eine Änderung der Glykosidbindungsstellen untersucht (150). Bei Hyperthyreose war die Zahl der Bindungsstellen für ^3H -g-Strophanthin im Skelettmuskel um 68 % vermehrt, bei Hypothyreose nahm sie um 50 % ab. Durch diese Studie wurde in vivo nachgewiesen, was man aufgrund von in vitro Experimenten längst vermutet hatte: Da bei Hyperthyreose niedrigere Digoxinkonzentrationen bei gleicher Ausscheidungskinetik gemessen worden waren (29, 70), mußte der Verteilungsraum, bzw. die Zahl der Bindungsstellen für Herzglykoside größer geworden sein (71). Diese Annahme wurde auch im Tierversuch mit Meerschweinchen und Ratten nach Gabe von Trijodthyronin bestätigt (91, 98, 170). Entsprechend der kli-

nischen Erfahrung verhalten sich auch andere Rezeptoren bei Hyperthyreose. So ist z. B. eine hyperthyreote Stoffwechsellage häufig mit einer Hyperglykämie kombiniert; eine Abnahme der Insulinrezeptoren am Menschen konnte bereits nachgewiesen werden (223). Auch nach Herzinfarkten, bei denen ebenfalls mit einer erhöhten Glykosidempfindlichkeit gerechnet werden muß, kommt es zu einer Abnahme der spezifischen Herzglykosidrezeptoren um bis zu 40 % (21, 91). Umgekehrt wurden bei Neugeborenen, die ja bekanntlich höhere Digoxinkonzentrationen pro kg Körpergewicht vertragen als Erwachsene, eine deutlich höhere Herzglykosidrezeptorenzahl bei verringerter Affinität gefunden. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse könnte der Mechanismus der gesteigerten Digitalisempfindlichkeit bei Hypokaliämie wie folgt ablaufen: An Erythrozyten ist die Zahl der Herzglykosidrezeptoren pro Zelle bei Hypokaliämie zwar verdoppelt, aber unerheblich, da Erythrozyten z. B. nur wenig Digitoxin binden können (etwa 2 % der Gesamtblutkonzentration) (175). Der Skelettmuskel aber stellt das größte Depot an Herzglykosid-Rezeptoren im Körper dar (256). Sein Pool an $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -Pumpen ist 50-100 mal größer, als am Herzmuskel (93, 149). Es ist einleuchtend, daß Einflußgrößen, die den Verteilungsraum für Herzglykoside verändern, sich auch auf den Glykosidspiegel auswirken müssen. Dazu zählt neben Lebensalter (143, 146, 204, 252), Hypo- und Hyperthyreose (12, 23, 29, 80, 150), Denervation und Muskeldystrophie (55, 57, 66, 67) auch Kaliummangel (40, 41, 92, 148, 190). Für den Kaliumhaushalt spielt der aktive $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -Transport in den Skelettmuskelzellen die entscheidende Rolle (147), da etwa 74 % des Gesamtkörperkaliums im Skelettmuskel lokalisiert sind (63). Es liegt nahe, daß eine

durch Hypokaliämie provozierte Abnahme der Digitalisrezeptoren im Skelettmuskel, zu einer Zunahme des Serumspiegels für Herzglykoside führt, da sich der Verteilungsraum für die Moleküle verringert. So wurde bereits nachgewiesen, daß bei Hypokaliämie die myokardiale Digoxinkonzentration höher als bei Kontrollen ist, trotz Gabe äquivalenter Glykosiddosen (248). Dieses Verteilungsphänomen in Kombination mit einer (wegen der niedrigen Kaliumkonzentration) gesteigerten Affinität aber unveränderten Bindungskapazität am Herzmuskel wäre dann als Ursache für eine Digitalisintoxikation bei Hypokaliämie anzusehen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

200 Jahre nach Withering sind Herzglykoside bewährte Pharmaka. Ihr genauer molekularer Wirkungsmechanismus ist zumindest umstritten. Bei Hypokaliämie besteht eine gesteigerte Digitalisempfindlichkeit.

Die Herzglykosid-Rezeptor-Bindung wurde u. a. untersucht

- unter Kaliumeinfluß
- bei Hypokaliämie
- durch Kontraktionsversuche
- an Erythrozyten, Herz und Skelettmuskel

Die wichtigsten Ergebnisse am Meerschweinchen sind:

1. Die Glykosid-Rezeptor-Bindung ist spezifisch, reversibel, zeit- und temperaturabhängig, folgt dem Massenwirkungsgesetz und ist mit einem pharmakologischen Effekt gekoppelt. Bei Auftragung der Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten nach Arrhenius zeigt sich ein Kurvenknick im Bereich von $10 - 20^{\circ}\text{C}$; hier ist auch die Aktivierungsenergie deutlich erhöht. Ursache für diese eingeschränkte Reaktionsfähigkeit ist vermutlich eine Phasenverschiebung unterhalb einer kritischen Temperatur mit Konformationsänderung der Membranproteine. Die Bindung von g-Strophanthin an den Herzglykosid-Rezeptor ist ein exergonischer Prozeß, wobei 4,8 kcal Wärme frei werden. Das System könnte bei geeigneter Versuchsanordnung ca. 10 kcal. Arbeit erbringen.
2. Homogenate sind zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_D am Skelettmuskel geeigneter als Zellmembranpräparatio-

nen, da nur sie eine Sättigungskinetik mit Äquilibrium aufweisen. Der M. soleus hat eine höhere Affinität für g-Strophanthin ($K_D = 0,48 \times 10^{-7} M$) als Herzmuskel oder Erythrozyten.

Die kardiale Dissoziationskonstante wurde mit drei verschiedenen Verfahren ermittelt und beträgt ca. $1,13 \times 10^{-7} M$. Die Gabe von Kalium senkt die Affinität des Rezeptors für Herzglykoside, ohne die Bindungskapazität zu beeinflussen. Hypokaliämie, provoziert durch eine kaliumarme Diät von 14 Tagen und kontrolliert durch Serumkaliumspiegel und Gesamtkörperkaliumgehalt, führt zu keiner Veränderung der Dissoziationskonstanten, unabhängig vom untersuchten Organ.

3. Die Bindungskapazität für g-Strophanthin ist in den Vorhöfen nur etwa halb so groß wie in den Ventrikeln. Die maximale Kontraktionskraftzunahme betrug an Papillarmuskeln 6.64 mN und an linken Vorhöfen 16.9 mN. Strophanthin-Konzentrationen von über $1 \times 10^{-6} M$ führten in der Regel zu Arrhythmie und Kontraktur, wobei der halbmaximale Effekt (EC_{50}) für Vorhöfe und Papillarmuskeln bei ca. $3.5 \times 10^{-7} M$ gemessen wurde. Die Konzentrations-Wirkungskurven von Vorhof-, Papillar- und Skelettmuskeln werden durch Hypokaliämie nicht verschoben.

4. Der Erythrozyt ist kein geeignetes Modell für den Herzmuskel. Die Herzglykosid-Rezeptorenzahl stieg durch kaliumarme Diät von ca. 420 auf 1020 pro Erythrozyt und war damit signifikant **erhöht**. Trotz Hypokaliämie blieb die Zahl der Bindungsstellen für g-Strophanthin am Herzmuskelhomogenat **konstant**. Bei Kaliummangel **verringerte** sich die Anzahl

der Herzglykosid-Rezeptoren im Skelettmuskelhomogenat von 0.15×10^{14} auf 0.10×10^{14} /g Feuchtgewicht.

Schlußfolgerung: Eine durch Hypokaliämie bedingte Abnahme des größten Depots für Herzglykosidrezeptoren im Körper, könnte in Kombination mit der unveränderten Bindungskapazität am Herzmuskel zu einer Erhöhung des Digitalisspiegels führen. Die Bindung an den Herzmuskel erfolgt dann aufgrund der niedrigen Kaliumkonzentration mit gesteigerter Affinität. Mit dieser Theorie sind glykosidbedingte Intoxikationen und die erhöhte Digitalisempfindlichkeit bei Hypokaliämie erklärbar.

6.1 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abb. 1 Wirkweise von Digitalis an der Herzmuskelzelle
- Abb. 2 Modell der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-Struktur
- Abb. 3 Modell des durch Herzglykoside ausgelösten transmembranösen Ca^{2+} -Transports
- Abb. 4 Versuchsaufbau zur Gesamtkörperkaliumbestimmung von Meerschweinchen
- Abb. 5 Muskeln an der lateralen Seite der hinteren Extremität von Meerschweinchen
- Abb. 6 Mechanismus der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase
- Abb. 7 Prinzip des optisch-kinetischen Tests
- Abb. 8 Versuchsaufbau zur Elektrostimulation und Kontraktionskraftmessung von Herzmuskeln
- Abb. 9 Elektrische Vorhofstimulation in einem mit Carbogen begasten Organbad
- Abb. 10 Reizstromgerät und 8-Kanalschreiber für Untersuchungen an Vorhöfen
- Abb. 11 Reizstrom- und Registriergerät für Messungen an Papillarmuskeln
- Abb. 12 Zeitabhängige Bindung von ^3H -g-Strophanthin an Herzmuskelzellmembranen unter K^+ -Einfluß
- Abb. 13 Assoziation des ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes von Herzmuskelzellmembranen in Abhängigkeit von der Temperatur
- Abb. 14 Dissoziation des ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes von Herzmuskelzellmembranen in Abhängigkeit von der Temperatur
- Abb. 15 Konzentrationsabhängige Bindung von ^3H -g-Strophanthin an Herzmuskelzellmembranen in Abhängigkeit von der Temperatur
- Abb. 16 Arrheniusauftragung der Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten von Herzmuskelzellmembranen in Abhängigkeit von Temperatur und Zeit
- Abb. 17 Van't-Hoff-Auftragung des Logarithmus der reziproken Gleichgewichtskonstanten von Herzmuskelzellmembranen gegen die entsprechenden Temperaturen
- Abb. 18 Energiediagramm der thermodynamischen Konstanten der g-Strophanthin-Rezeptorbindung an Herzmuskelzellmembranen bei 37°C
- Abb. 19 Energieprofil der thermodynamischen Konstanten der g-Strophanthin-Rezeptorbindung an Herzmuskelzellmembranen bei 10°C
- Abb. 20 Konzentrationsabhängiger Kaliumeffekt auf die Bindung von ^3H -g-Strophanthin an Herzmuskelzellmembranen
- Abb. 21 Bestimmung der halbmaximalen Hemmkonzentration I_{50} von Kalium für die ^3H -g-Strophanthin-Bindung an Herzmuskelzellmembranen
- Abb. 22 Kaliumeffekt auf die Assoziationsgeschwindigkeit des ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes von Herzmuskelzellmembranen
- Abb. 23 Kaliumeffekt auf die Dissoziation des ^3H -g-Strophanthin-Rezeptor-Komplexes von Herzmuskelzellmembranen
- Abb. 24 Konzentrationsabhängige Bindung von ^3H -g-Strophanthin an Herzmuskelzellmembranen in Gegenwart von 1 mM K^+
- Abb. 25 Kaliumeffekte auf die konzentrationsabhängige Bindung von ^3H -g-Strophanthin an Herzmuskelzellmembranen
- Abb. 26 Lineweaver-Burk-Auftragung der konzentrationsabhängigen Bindung von ^3H -g-Strophanthin an Herzmuskelzellmembranen unter Kaliumeinfluß
- Abb. 27 Zeitabhängige Bindung von ^3H -g-Strophanthin an Herzmuskelzellmembranen incl. Kaliumwirkung

- Abb. 28 Einfluß von Hypokaliämie auf die konzentrationsabhängige Bindung von ^3H -g-Strophanthin an linksventrikuläres Herzmuskelhomogenat
- Abb. 29 Einfluß von Hypokaliämie auf die konzentrationsabhängige Bindung von ^3H -g-Strophanthin an rechtsventrikuläres Herzmuskelhomogenat
- Abb. 30 Einfluß von Hypokaliämie auf die konzentrationsabhängige Bindung von ^3H -g-Strophanthin an linksatriales Herzmuskelhomogenat
- Abb. 31 Einfluß von Hypokaliämie auf die konzentrationsabhängige Bindung von ^3H -g-Strophanthin an rechtsatriales Herzmuskelhomogenat
- Abb. 32 Einfluß von Hypokaliämie auf die Konzentrations-Wirkungskurve für den positiv inotropen Effekt von g-Strophanthin an linken Vorhöfen
- Abb. 33 Einfluß von Hypokaliämie auf die Konzentrations-Wirkungskurve für den positiv inotropen Effekt von g-Strophanthin an rechtsatrialen Papillarmuskeln
- Abb. 34 Zeitabhängiger Verlauf der g-Strophanthin-Wirkung auf die Kontraktionskraft elektrisch stimuliert schlagender linker Vorhöfe
- Abb. 35 Zeitabhängiger Verlauf der g-Strophanthin-Wirkung auf die Kontraktionskraft elektrisch stimuliert schlagender rechtsventrikulärer Papillarmuskeln
- Abb. 36 Zeitabhängige Bindung von ^3H -g-Strophanthin an Skelettmuskelhomogenat
- Abb. 37 Kaliumeffekt auf die zeitabhängige Bindung von ^3H -g-Strophanthin an Skelettmuskelhomogenat
- Abb. 38 Einfluß von Hypokaliämie auf die konzentrationsabhängige Bindung von ^3H -g-Strophanthin an Skelettmuskelhomogenat des M. soleus
- Abb. 39 Einfluß von Hypokaliämie auf die konzentrationsabhängige Bindung von ^3H -g-Strophanthin an Erythrozyten
- Abb. 40 Konzentrations-Wirkungskurven für den positiv inotropen Effekt von g-Strophanthin an linken Vorhöfen und rechtsventrikulären Papillarmuskeln bei normo- und hypokaliämischen Meerschweinchen
- Abb. 41 Wirkung von g-Strophanthin auf elektrisch stimuliert schlagende Skelettmuskelstreifen des M. soleus von normo- und hypokaliämischen Meerschweinchen

6. 2. TABELLENVERZEICHNIS

- Tab. 1: Zahl der Verordnungen der drei am häufigsten verschriebenen Präparate in Deutschland
- Tab. 2: Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten (k_{+1}) an Herzmuskelzellmembranen in Abhängigkeit von der Temperatur
- Tab. 3: Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten (k_{-1}) an Herzmuskelzellmembranen in Abhängigkeit von der Temperatur
- Tab. 4: Bestimmung der temperaturabhängigen Dissoziationskonstanten (K_D) an Herzmuskelzellmembranen nach 3 verschiedenen Methoden
- Tab. 5: Thermodynamische Konstanten der g-Strophanthin-Rezeptorbindung im Gleichgewichtszustand unter Standardbedingungen
- Tab. 6: Thermodynamische Konstanten der g-Strophanthin-Rezeptorbindung im Übergangszustand unter Aktivierungsbedingungen
- Tab. 7: Arterielle Blutgase nach kaliumarmer Diät
- Tab. 8: Venöse und arterielle Blutgase bei normaler Ernährung
- Tab. 9: Körpergewicht nach kaliumarmer Diät
- Tab. 10: Kaliumkonzentration im Serum nach kaliumarmer Diät
- Tab. 11: Ganzkörperkaliumgehalt nach kaliumarmer Diät
- Tab. 12: Untersuchungen am linken Ventrikel nach kaliumarmer Diät
- Tab. 13: Untersuchungen am rechten Ventrikel nach kaliumarmer Diät
- Tab. 14: Untersuchungen am linken Vorhof nach kaliumarmer Diät
- Tab. 15: Untersuchungen am rechten Vorhof nach kaliumarmer Diät
- Tab. 16: Untersuchungen am M. soleus nach kaliumarmer Diät
- Tab. 17: Verhältnis von Proteingehalt und Feuchtgewicht bei Kaliummangel in Ventrikel, Vorhof und M. soleus
- Tab. 18: Zahl der Herzglykosidrezeptoren an Erythrozyten im Vergleich zur Dissoziationskonstante K_D bei Hypokaliämie
- Tab. 19: Änderungen der Herzglykosidrezeptoren bei Hypokaliämie
- Tab. 20: Herzglykosid-Rezeptordichte bei verschiedenen Spezies
- Tab. 21: Herzglykosid-Bindungsstellen an Erythrozyt und Herz

6.3 LITERATURVERZEICHNIS

1. ALTON, J. F., LAMB, J.F., OGDEN, P.:
Down-regulation of the sodium pump following chronic exposure of HeLa cells and chick embryo heart cells to ouabain.
Br. J. Pharmac. 73, 333 - 340 (1981)
2. AKERA, T., HOOK, J.B., TOBIN, T., BRODY, T. M.:
Cardiac glycoside sensitivity of (Na^+K^+) -activated ATPase in new-born rats.
Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 4, 699 -706 (1972)
3. AKERA, T., BASKIN, S. I., TOBIN, T., BRODY, T. M.:
Ouabain: Temporal relationship between the inotropic effect and the in vitro binding to, and dissociation from, (Na^+K^+) -activated ATPase.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 277, 151 - 162 (1973)
4. AKERA, T.:
Membrane Adenosinetriphosphatase: A Digitalis Receptor?
Science, 198, 569 - 574 (1977)
5. AKERA, T., TEMMA, K., WIEST, S. A., BRODY, T. M.:
Reduction of the equilibrium binding of cardiac glycosides and related compounds to Na^+ , K^+ -ATPase as a possible mechanism for the potassium-induced reversal of their toxicity.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 304, 157 - 165 (1978)
6. AKERA, T., BRODY, T. M.:
The role of Na^+ , K^+ -ATPase in the inotropic action of digitalis.
Pharmacol. Rev. 29, 187 - 220 (1978)
7. ALKEN, R. G., SEMJAN, R., MILLER, A., RIETBROCK, N.:
Farbsehstörungen unter Digoxintherapie.
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 86, 1276 - 1280 (1980)
8. ALLEN, J.C., SCHWARTZ, A.:
Effects of Na^+ , K^+ -ATPase, temperature and time on ouabain with the cardiac Na^+ , K^+ -ATPase: further evidence supporting an allosteric site.
J. Mol. Cell. Cardiol. 1, 39 - 45 (1970)
9. ANDERSON, G.J.:
 K^+ mediated release of ouabain from purkinje cells.
Am. J. Cardiol. 33, 113 (1974)
10. ANDERSON, G. J., BAILEY, J. C., REISER, J., FREEMAN, A.:
Electrophysiological observations on the digitalis-potassium interaction in canine purkinje fibres.
Circ. Res. 39, 717 - 723 (1976)
11. ARNIM, TH. V., KRAWIETZ, W., VOGT, W., ERDMANN, E.:
Is the determination of serum digoxin concentration useful for the diagnosis of digitalis toxicity?
Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol. 18, 261 -268 (1980)

12. ASANO, Y., LIBERMAN, U. A., EDELMAN, I. S.:
Thyroid thermogenesis. Relationship between Na^+ -dependent respiration and Na^+ - K^+ -ATPase-activity in rat skeletal muscle.
J. Clin. Invest. 57, 368 - 379 (1976)
13. ASTRUP, J.:
The effect of hypokaliämia and of Digoxin therapy on red cell sodium and potassium content. Some clinical aspects.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 33, 11 - 16 (1974)
14. AYALA, J., NIETO, M., CARREIRA, J., MUNOZ, E.:
Activation parameters of the adenosine triphosphatase of micrococcus lysodeikticus. A comparison of the soluble and membrane-bound forms of the enzyme.
Eur. J. Biochem. 66, 43 - 47 (1976)
15. BAEDEKER, W., WIRTZFELD, A.:
Rhythmusstörungen bei Digitalis-Intoxikation.
Int. J. Clin. Pharmacol. 8, 292 - 301 (1973)
16. BAEDEKER, W.:
Digitalis als Ursache von Herzrhythmusstörungen.
Ther. Ggw. 117, 1590 - 1604 (1978)
17. BAKER, P. F., WILLIS, J. S.:
Potassium ions and the binding of cardiac glycosides to mammalian cells.
Nature 226, 521 - 523 (1970)
18. BAKER, P.F., WILLIS, J. S.:
Binding of the cardiac glycoside ouabain to intact cells.
J. Physiol., Lond. 224, 441 - 462 (1972)
19. BATAILLE, D., FREYCHET, P., ROSSELIN, P.:
Interactions of glucagon, vasoactive intestinal polypeptide and secretin with liver and fat cell plasma membranes: binding to specific sites and stimulation of adenylate cyclase.
Endocrinology 95, 713 - 721 (1974)
20. BELLER, G. A., SMITH, T. W., ABELMANN, W. H., HABER, E., HOOD, W. B.:
Digitalis intoxication. A prospective study with serum level correlations.
N. Engl. J. Med. 284, 989 - 997 (1971)
21. BELLER, G. A., CONROY, J., SMITH, T. W.:
Altered myocardial $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase activity following acute myocardial ischemia.
Circ. 40, III - 11 (1974)
22. BENZER, H., FREY, R., HÜGIN, W., MAYRHOFER, O.:
Lehrbuch der Anaesthesiologie, Reanimation und Intensivtherapie. Die Anaesthesie im Kindesalter.
Springer Verl., Berlin, Heidelberg, New York, 544 (1977)

23. BIRON, R., BURGER, A., CHINET A., CLAUSEN T., DUBOIS-FERRIERE, R.:
Thyroid hormones and the energetics of active sodium-potassium
transport in mammalian skeletal muscles.
J. Physiol. 297, 47 - 60 (1979)
24. BISMUTH, C., GAULTIER, M., CONSO, F., EFFHYMIU, M. L.:
Hyperkalemia in acute digitalis poisoning: Diagnostic significance
and therapeutic implications.
Clin. Toxicol. 6, 153 - 162 (1973)
25. BLAUSTEIN, M. P.:
The interrelationship between sodium and calcium fluxes across cell
membranes.
Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 70, 33 - 82 (1974)
26. BLAUSTEIN, M. P.:
Sodium ions, calcium ions, blood pressure regulation, and
hypertension: a reassessment and a hypotheses.
Am. J. Physiol. 232, 165 - 173 (1977)
27. BLUSCHKE, V., BONN, R., GREEFF, K.:
Increase in the $(Na + K)^+$ -ATPase activity in heart muscle after
chronic treatment with digitoxin or potassium deficient diet.
Eur. J. Pharmacol. 37, 189 - 191 (1976)
28. BOLTE, H. D., LÜDERITZ, B., ERDMANN, E.:
Beziehungen zwischen Elektrolytstörungen und Glykosidwirkungen.
In: Kluthe, R. (Hrsg.) *Medikamentöse Therapie bei Nierenerkrankungen.*
Thieme, Stuttgart, 139 - 143 (1971)
29. BONELLI, J., HAYDL, H., HRUBY, K., KAIK, G.:
The pharmacokinetics of digoxin in patients with manifest
hyperthyroidism and after normalization of thyroid function.
Int. J. Clin. Pharmacol. 16, 302 - 306 (1978)
30. BOZLER, E.:
The initiation of impulses in cardiac muscle.
Am. J. Physiol. 138, 273 - 282 (1943)
31. BRAUNWALD, E.:
Mechanism of Action of Calcium-Channel-Blocking Agents.
N. Engl. J. Med. 307/26, 1618 - 1627 (1982)
32. BRAY, G. M., WILCOX, W., AGUAYO, A. J.:
Ouabain binding sites in skeletal muscle from normal and dystrophic
mice.
J. Neurol. Sci. 34, 149 - 156 (1977)
33. BROWN, L., WERDAN, K., ERDMANN, E.:
Consequences of specific H -ouabain binding to guinea pig left atria
and cardiac cell membranes.
Biochem. Pharmacol. 32/3, 423 - 435 (1983)
34. BROWN, L., ERDMANN, E., THOMAS, R.:
Digitalis structure-activity relationship analyses. Conclusions from
indirect binding studies with cardiac $(Na + K)^+$ -ATPase.
Biochem. Pharmacol., 32/18, 2767 - 2774 (1983)

35. BROWN, L., THOMAS, R.:
Comparison of the inotropic potencies of some synthetic and naturally occurring cardiac glycosides using isolated left atrium of guinea pig.
Arzneimittelforsch. 33, 814 (1983).
36. BROWN, L., ERDMANN, E.:
Binding of Digitalis Derivates of Beef, Cat and Human Cardiac (Na⁺+K⁺)-ATPase. Affinity and kinetic constants.
Arch. Intern. Pharmacodyn. Ther. 271/2, 229 - 240 (1984)
37. BROWN, L., ERDMANN, E.:
Comparison of the affinity of human, beef and cat heart (Na⁺+K⁺)-ATPase for different digitalis derivatives.
Arzneimittelforsch. 34/10, 1314 - 1318 (1984)
38. BROWN, L., ERDMANN, E.:
Two binding sites for ouabain in cardiac cell membranes.
In: Erdmann, E. (ed): cardiac glykoside receptors and positive inotropy. Evidence for more than one receptor?
Suppl. Bas. Res. Card., Steinkopff-Verl., 79, 30 - 55 (1984)
39. BROWN, L., HUG, E., WAGNER, G., ERDMANN, E.:
Comparison of ouabain receptors in sheep myocardium and purkinje fibres.
Zur Veröffentlichung eingereicht: Biochem. Pharmacol. (1985)
40. BROWN, L., WAGNER, G., ERDMANN, E.:
Ouabain receptors in acute hypokalaemia in guinea pigs.
Abstract: Europ. J. Clin. Invest. 15: A4 (1985)
41. BROWN, L., WAGNER, G., HUG, E., ERDMANN, E.:
Ouabain binding and inotropy in acute potassium depletion in guinea pigs.
Zur Veröffentlichung eingereicht: Cardiovasc. Res. (1985)
42. BURNELL, J. M., VILLAMIL, M. F., UYENO, D. T., SCRIBNER, B. J.:
The effect in humans of extracellular pH change on the relationship between serum potassium concentration and intracellular potassium.
J. Clin. Invest. 35, 935 (1956)
43. BUSEMEYER I.:
Retrospektive Studie zur Problematik der Digitalisintoxikation.
Med. Dissertation, Universität Mainz (1978)
44. BUSSE, F., LÜLLMANN, H., PETERS, T.:
Concentration-dependence of binding of cardiac glycoside to atrial muscle.
J. Cardiovasc. Pharmac. 1, 687 (1979)
45. CALDWELL, P. C., KEYNES, R. D.:
The effect of ouabain on the efflux of sodium from a squid giant axon.
J. Physiol. 148, 8-9 (1959)

46. CAMERON, J. R., WARD, J. P. T.:
Adaption of the sodium pump to chronic potassium lack.
J. Physiol. 8 P, 316 (1981)
47. CHAN, P. C., SANSLONE, W. R.:
The influence of a low-potassium diet on rat-erythrocyte-membrane
adenosine triphosphatase.
Arch. Biochem. Biophys. 134, 48 - 52 (1969)
48. CHARNOCK, J. S., COOK, D. A., ALMEIDA, A. F., TO, R.:
Activation energy and phospholipid requirements of membrane-bound
ATPases.
Arch. Biochem. Biophys. 159, 393- 399 (1973)
49. CHARNOCK, J. S., SIMONSON, L. P., ALMEIDA, A. F.:
Variation in sensitivity of the cardiac glycoside receptor
characteristics of (Na⁺+K⁺)-ATPase to lipolysis and temperature.
Biochim. Biophys. Acta 465, 77 - 92 (1977)
50. CHRISTEN, H. R.:
Chemie. Der Verlauf chemischer Vorgänge.
Verl. Sauerländer, Aarau und Frankfurt/Main, Verl. Moritz Diesterweg,
Otto Salle Verlag, Frankfurt/Main, 160-181 (1977)
51. CHUNG, E. K.:
Digitalis intoxication.
Williams & Wilkins, Baltimore (1969)
52. CHUNG, E. K.:
Digitalis intoxication.
Postgrad Med. J. 48, 163 - 179 (1972)
53. CLARK, A. J.:
The mode of action of drugs on cells.
Williams & Wilkins, Baltimore (1933)
54. CLAUSEN, T., HANSEN, O.:
Ouabain binding and Na⁺-K⁺-transport in rat muscle cells and
adipocytes.
Biochim. Biophys. Acta 345, 387 - 404 (1974)
55. CLAUSEN, T., SELLIN, L. C., THESLEFF, S.:
Quantitative changes in ouabain binding after denervation and during
reinnervation of mouse skeletal muscle.
Acta Physiol. Scand III, 373 - 375 (1981)
56. CLAUSEN, T., HANSEN, O., KJELSEN, K., NØRGAARD, AA.:
Effect of age, potassium depletion and denervation on specific
displaceable ³H-Ouabain binding in rat skeletal muscle in vivo.
J. Physiol. 333, 367 - 381 (1982)
57. CLAUSEN, T., KJELSEN, K., NØRGAARD, AA.:
Effects of denervation on sodium, potassium and ³H-ouabain binding in
muscles of normal and potassium-depleted rats.
J. Physiol. 345, 123 (1984)

58. CONN, J. W., ROVNER, D. R., COHEN, E. L.:
Licorice-induced pseudoaldosteronism.
J. Amer. Med. Ass. 205, 492 (1968)
59. CUATRECASAS, P.:
Insulin Receptor of Liver and Fat Cell Membranes.
Fed. Proc. 32, 1838 - 1846 (1973)
60. CUMBERBATCH, M., MORGAN, D. B.:
Erythrocyte sodium and potassium in patients with hypokalaemia.
Clin. Science 64, 167 - 176 (1983)
61. DAHL, J. L. HOKIN, L. E.:
The sodium-potassium adenosine-triphosphatase.
Ann. Rev. Biochem. 43, 327 - 356 (1974)
62. DAUT, J., RÜDEL, R.:
Cardiac glycoside binding to the Na/K-ATPase in the intact myocardial cell: Electrophysiological measurement of chemical kinetics.
J. Mol. Cell Cardiol. 13, 777 - 782 (1981)
63. DE FRONZO, R. A., BIA, M., SMITH, D.:
Clinical disorders of hyperkalemia.
Ann. Rev. Med. 33, 521 - 554 (1982)
64. DENES, B., GREEFF, K.:
Effects of cardiac glycosides on skeletal muscle.
In: Handbook of experimental pharmacology 56/I.
Springer Verl. Berlin, Heidelberg, New York 517-532 (1981)
65. DE POVER, A., GODEFRAND, T.:
Interaction of ouabain with $(Na^+ + K^+)$ -ATPase from human heart and from guinea-pig heart.
Biochem. Pharmacol. 28, 3051 - 3056 (1979)
66. DESAIAH, D., MISHRA, S. K., HOBBSON, M.:
Quantitative measurements of 3H -ouabain binding to human skeletal muscle cryostat sections.
J. Neurol. Sci. 51, 457 - 464 (1981)
67. DESNUELLE, C., LOMBET, A., SERRATRICE, G., LAZDUNSKI, M.:
Sodium channel and sodium pump in normal and pathological muscles from patients with myotonic musculatur dystrophy and lower motor neuron impairment.
J. Clin. Invest. 69, 358 (1982)
68. DETWEILER, D. K.:
Comparative pharmacology of cardiac glycosides.
Fed. Proc. 26, 1119 - 1124 (1976)
69. DOERING, W., KÖNIG, E., STURM, W.:
Digitalis intoxication: Specificity and significance of cardiac and extracardiac symptoms. Part I. Patients with digitalis-induced arrhythmias.
Z. Kardiol. 66, 121 - 128 (1977)

70. DOHERTY, J. E., PERKINS, W. H.:
Digoxin metabolism in hypo- and hyperthyroidism.
Ann. Int. Med. 64, 489 - 507 (1966)
71. DOHERTY, J. E., PERKINS, W. H., GAMMILL, J., SHERWOOD, J., DODD, C.,
YOUNG, C. C.:
The influence of thyroid function on digoxin metabolism.
In: Symposium on Digitalis, Gyldendal Norsk Forlag, Oslo, 348 - 361
(1973)
72. DOHERTY, J. E., KANE, J. J., PHILLIPS, J. R., ADAMSON, J. S.:
Digitalis in pulmonary heart disease (Cor pulmonale).
Drugs 13, 142 - 151 (1977)
73. DOW, J. W., HARDING, N. G. L., POWELL, T.:
Isolated cardiac myocytes. II. Functional aspects of mature cells.
Cardiovasc. Res. 15, 549 - 579 (1981)
74. DUDEL, J.:
Erregung von Nerv und Muskel.
In: Schmidt, R. F., Thews, G. (Hrsg.): Physiologie des Menschen.
Springer Verl., Berlin, Heidelberg, New York, 7 - 32 (1977)
75. DUHME, D. W., GREENBLATT, D. J., KOCH-WESER, J.:
Reduction of digoxin toxicity associated with measurement of serum
levels. A report from the Boston Collaborative Drug Surveillance
Program.
Ann. Intern. Med. 80, 516 - 519 (1974)
76. DUNHAM, P. B., HOFFMANN, J. F.:
Partial purification of the ouabain-binding component and of Na, K-
ATPase from human red cell membranes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 66, 936 - 943 (1970)
77. DUTTA, S., GOSWAMI, S., LINDOWER, J. Q., MARKS, B. H.:
Subcellular distribution of digoxin-H³ in isolated guinea-pig and
rat hearts.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 159, 324 - 334 (1968)
78. EDMONDS, C. J., IASANI, B. M.:
Total-body potassium in hypertensive patients during prolonged
diuretic therapy.
Lancet 2, 8 - 12 (1972)
79. EHRLICH, P.:
On partial functions of the cell; Nobel Lecture: In the collected
Papers of P. Ehrlich, Vol. III. (F. Himmelweit, M. Marquardt,
H. Dale, eds.).
Pergamon Press, Oxford, 183 (1956)
80. EICHELBAUM, M.:
Drug metabolism in thyroid disease.
Clin. Pharmacokinetics 1, 339 - 350 (1976)

81. ERDMANN, E., BOLTE, H.-D., LÜDERITZ, B.:
(Na⁺+K⁺)-ATPase activity of guinea pig heart muscle in potassium deficiency.
Arch. Biochem. Biophys. 145, 121 - 125 (1971)
82. ERDMANN, E., SCHONER, W.:
Ouabain-receptor interactions in (Na⁺+K⁺)-ATPase preparations from different tissues and species. Determination of kinetic constants and dissociation constants.
Biochim. Biophys. Acta 307, 386 - 398 (1973)
83. ERDMANN, E., SCHONER, W.:
Ouabain-receptor interactions in (Na⁺+K⁺)-ATPase preparations. II. Effects of cations and nucleotides on rate constants and dissociation constants.
Biochim. Biophys. Acta 330, 302 - 315 (1973)
84. ERDMANN, E., SCHONER, W.:
Ouabain-receptor interactions in (Na⁺+K⁺)-ATPase preparations. IV. The molecular structure of different cardioactive steroids and other substances and their affinity to the glycoside receptor.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 283, 335 - 356 (1974)
85. ERDMANN, E., HASSE, W.:
Quantitative aspects of ouabain binding to human erythrocyte and cardiac membranes.
J. Physiol. (London) 251, 671 - 682 (1975)
86. ERDMANN, E., PRESEK, P., SWOZIL, R.:
Über den Einfluß von Kalium auf die Bindung von Strophanthin an menschliche Herzmuskelzellmembranen.
Klin. Wschr. 54, 383 - 387 (1976)
87. ERDMANN, E., PHILIPP, G., TANNER, G.:
Ouabain-receptor interactions in (Na⁺+K⁺)-ATPase preparations. A contribution to the problem of nonlinear Scatchard plots
Biochim. Biophys. Acta 455, 287 - 296 (1976)
88. ERDMANN, E., KRAWIETZ, W.:
Increased number of ouabain binding sites in human erythrocyte membranes in chronic hypokalaemia.
Acta Biol., Med. Germ. 36, 879 - 883 (1977)
89. ERDMANN, E.:
Cell membrane Receptors for Cardiac Glycosides in the Heart.
Basic Res. Cardiol. 72, 315 - 325 (1977)
90. ERDMANN, E.:
Die Herzglykosidintoxikation.
D. Inform. Arzt 11, 102 - 112 (1977)
91. ERDMANN, E.:
Quantitative Aspekte der spezifischen Bindung von Herzglykosiden an Membranrezeptoren.
Habilitationsschrift, Universität München (1978)

92. ERDMANN, E., KRAWIETZ, W., KOCH, M.:
Cardiac glycoside receptors in disease. The number of ouabain binding sites in human erythrocytes is subject to regulation.
In: Na^+/K^+ -ATPase structure and kinetics. Skou, J.C., Nørby, J.G. (eds.), London, Academic Press, 517 - 524 (1979)
93. ERDMANN, E., PHILIPP, G., SCHOLZ, H.:
Cardiac glycoside receptor, (Na^+/K^+) -ATPase activity, and force of contraction in rat heart.
Biochem. Pharmac. 29, 3219 - 3229 (1980)
94. ERDMANN, E., BOLTE, H. D.:
Über den Mechanismus der Herzglykosidwirkung unter besonderer Berücksichtigung des Digitoxins. In: Digitalistherapie bei Herzinsuffizienz. Edit.: Kochsiek, K., Rietbrock, N. Urban und Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore, 66 - 70 (1981)
95. ERDMANN, E.:
Influence of cardiac glycosides on their receptor.
In: Greeff, K. Handbook of Experimental Pharmacology Vol.56 Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 337 - 380 (1981)
96. ERDMANN, E.:
Biochemische Grundlagen der Wirkung von Digitalisglykosiden. Fortschr. Kardiol. 48, Steinkopff Verl., Darmstadt, 7 - 118 (1982)
97. ERDMANN, E.:
Ist eine Digitalistherapie immer lebenslang notwendig?
Kongressbericht, Berlin. Der Kassenarzt 22, Heft 20, Verl. Kern & Birner, Frankfurt/Main, 2718 - 2725 (1982)
98. ERDMANN, E., BROWN, L.:
The cardiac glycoside-receptor system in the human heart.
Eur. J. Cardiol. (Suppl.) 4, 61 - 65 (1983)
99. ERDMANN, E.:
Wirkungsmechanismus der Herzglykoside.
In: Therapie mit Herzglykosiden
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1 - 7 (1983)
100. ERDMANN, E.:
Therapie der akuten und chronischen Herzinsuffizienz mit Herzglykosiden. Herzinsuffizienz. Hsg. G. Riecker
Springer Verlag, 564 - 626 (1984)
101. ERDMANN, E., BROWN, L., WERDAN, K.:
Two receptors for cardiac glycosides in the heart.
In: Erdmann, E. (ed.): Cardiac glycoside receptors and positive inotropy. Evidence for more than one receptor?
Suppl. Bas. Res. Cardiol. 79: 21 - 26 (1984)
102. ERDMANN, E., WERDAN, K., KRAWIETZ, W.:
Influence of digitalis and diuretics on ouabain binding sites on human erythrocytes.
Klin. Wochenschr. 62, 87 - 92 (1984)

103. EVERED, D. C., CHAPMAN, C.:
Plasma digoxin concentrations and digoxin toxicity in hospital patients.
Br. Heart J. 33, 540 (1971)
104. FISCH, C., KNOEDEL, S. B., FEIGENBAUM, H.:
Potassium and the monophasic action potential, electrocardiogram, conduction and arrhythmics.
Prog. Cardiovasc. Dis. 8, 387 - 405 (1966)
105. FORBUSH, B., HOFFMANN, J. F.:
Evidence that ouabain binds to the same large polypeptide chain of dimeric Na, K-ATPase that is phosphorylated from P_i .
Biochemistry 18, 2308 - 2315 (1979)
106. FRANK, G. B.:
The current view of the source of trigger calcium in excitation-contracting coupling in vertebrate skeletal muscle.
Biochim. Pharmacol. 29, 2399 - 2406 (1980)
107. FRICKE, U.:
Myocardial activity of inhibitors of the Na^+K^+ -ATPase:
Differences in the mode of action and subcellular distribution pattern.
Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 303, 197 - 204 (1978)
108. FRIEDMAN, J., SCHWALB, H., HALLAQ, H., PINSON, A., HELLER, M.:
Interactions of cardiac glycosides with cultured cardiac cells.
II. Biochemical and electron microscopic studies on the effects of ouabain on muscle and non-muscle cells.
Biochim. Biophys. Acta 598, 272 - 284 (1980)
109. GARDNER, J. D., KIINO, D. R.:
Ouabain binding and cation transport in human erythrocytes.
J. Clin. Invest. 52, 1845 - 1851 (1973)
110. GARDNER, J. D., FRANTZ, C.:
Effects of cations on ouabain binding by intact human erythrocytes.
J. Membrane Biol. 16, 43 - 64 (1974)
111. GELBART, A., HALL, R. J., GOLDMAN, R.:
Effects of hypokalemia on the cardiotropic actions of Digoxin in dogs.
Circ. Res. (Supp. I) 46, 173 - 174 (1980)
112. GILFRICH, H. J.:
Therapie der Herzglykosidintoxikation.
In: Erdmann, E.: Therapie mit Herzglykosiden.
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 108 - 127 (1983)
113. GLITSCH, H. G., REUTER, H., SCHOLZ, H.:
The effect of the internal sodium concentration on calcium fluxes in isolated guinea pig auricles.
J. Physiol. 209, 25 - 43 (1970)

114. GLYNN, J. M., KARLISH, S. J. D.:
The sodium pump.
Ann. Rev. Physiol. 37, 13 - 55 (1975)
115. GODFRAIND, T.:
Cardiac glycoside receptors in the heart.
Biochem. Pharmacol. 24, 823 - 827 (1975)
116. GODFRAIND, T.:
Subclassification of cardiac glycoside receptors.
In: Erdmann, E. (ed.): Cardiac glycoside receptors and positive inotropy. Evidence for more than one receptor?
Suppl. Bas. Res. Cardiol. 79, 27 - 34 (1984)
117. GOODMAN, S. L., GILMAN, A.:
The pharmacological basis of therapeutics.
Mamillan Publishing Co. Inc. New York, USA, 754 (1980)
118. GOSHIMA, K., WAKABAYASHI, S.:
Involvement of an $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{++}$ -exchange system in genesis of ouabain induced arrhythmias of cultured myocardial cells.
J. Molec. Cell. Cardiol. 13, 489 - 509 (1981)
119. GREEFF, K., SCHADEWALDT, H.:
Introduction and remarks on the history of cardiac glycosides.
In: Greeff, K., (ed), Handbook of experimental pharmacology, Vol 56/1
Cardiac glycosides, Springer Verlag, 1 - 12 (1981)
120. GRISHAM, C. M., BARNETT, R. E.:
The role of lipid-phase transitions in the regulation of the (sodium + potassium) adenosine triphosphatase.
Biochemistry 12, 2635 - 2637 (1973)
121. GROSS, F.:
Verschreibungen von Arzneimitteln in der Bundesrepublik.
Münchn. Med. Wschr. 125 Nr. 28, 660 - 670 (1983)
122. HALL, R. J., GELBART, A., BILLINGHAM, M., SNIDOW, G., GOLDMAN, R. H.:
Effekt of chronic potassium depletion on digitalis-induced inotropy and arrhythmias.
Cardiovascular Research, 15, 98 - 107 (1981)
123. HALL, R. J. C., CAMERON, I. R.:
Effect of chronic dietary potassium depletion and repletion on cardiac and skeletal muscle structure, electrolytes and pH in the rabbit.
Clin. Sci. 60, 441 - 449 (1981)
124. HANSEN, O.:
The relationship between g-Strophanthin-binding capacity and ATPase-activity in plasma membrane fragments of ox brain.
Biochim. Biophys. Acta 223, 122 - 132 (1971)
125. HEBERER, G., KÖLE, W., TSCHERNE, H.:
Chirurgie.
Springer Verl. Berlin, Heidelberg, New York, 29 -30 (1983)

126. HOLFORD, F. D., MITHOEFER, J. C.:
Cardiac arrhythmias in hospitalized patients with chronic obstructive pulmonary disease.
Am. Rev. Res. Dis. 108, 879 - 885 (1973)
127. HOFFMANN, J. F.:
The red cell membrane and the transport of sodium and potassium.
Am. J. Med. 41, 666 - 680 (1966)
128. HORVATH, I., KIRALY, C., SUERB, J.:
Action of cardiac glycosides on the polymerisation of actin.
Nature 165, 792 (1949)
129. HURST, J. W., LOGUE, R. B.:
The heart.
Mc Graw-Hill Inc., New York, USA (1970)
130. IDRIS, I.:
Läßt sich Digitalis ersetzen?
Selecta 46, 4318 - 4331 (1982)
131. ISENBERG, G.:
Contractility of isolated bovine ventricular myocytes is enhanced by intracellular injection of cardioactive glycosides. Evidence for an intracellular mode of action.
In: Erdmann, E. (ed), Cardiac Glycoside Receptors and Positive Inotropy.
Basic Res. Cardiol. 79, Steinkopff-Verlag, Darmstadt, 56- 72 (1984)
132. JACOBSEN, A. L.:
Effect of ouabain on the ATPase of cardiac myosin B at high ionic strength.
Circ. Res 22, 625 - 632 (1968)
133. JAHRMÄRKER, H.:
Probleme der Digitalisintoxikation.
In: Jahrmärker H. (Hrsg.) Digitalistherapie.
Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 80 - 84 (1975)
134. JÄHNIG, F., BRAMHALL, J.:
The origin of a break in Arrheniusplots of membrane processes.
Biochim. Biophys. Acta 690, 310 - 313 (1982)
135. JOGESTRAND, T., SUNDQVIST, K.:
Skeletal muscle digoxin concentration during digitalization and during withdrawal of digoxin treatment.
Eur. J. Clin. Pharmacol. 19 (2), 89 - 95 (1981)
136. JORGENSEN, P. L.:
Isolation and characterization of the components of the sodium pump.
Quart. Rev. Biophys. 7, 239 - 274 (1975)
137. JORGENSEN, P. L.:
Mechanism of the Na^+ , K^+ -pump. Proteinstructure and conformation of the pure $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase.
Biochim. Biophys. Acta 694, 27 - 68 (1981)

138. JUNGERMANN, K., MÖHLER, H.:
Biochemie.
Springer Verlag New York, 438, 458 (1980)
139. KAISER R., GOTTSCHALK, G.:
Statistik.
Bibliograph. Inst. AG, Mannheim (1972)
140. KARLIN, A.:
Molecular interactions of the acetylcholine receptor.
Fed. Proc. 32, 1847 - 1853 (1973)
141. KATHER, H., SIMON, B.:
Adenylate cyclase of human fat cell ghosts. Stimulation of enzyme activity by parathyroid hormone.
J. Clin. Invest. 59, 730 - 733 (1977)
142. KAZAZOGLU, T., RENAUD, J. F., ROSSI, B., LADUNSKI, M.:
Two classes of ouabain receptors in chick ventricular cardiac cells and their relation to $(Na^{+}K^{+})$ -ATPase inhibition, intracellular Na accumulation, Ca^{++} influx and cardiotonic effect.
J. Biol.Chem. 258, 12163 - 12170 (1983)
143. KEARIN, M., KELLY, J. G., O'MALLEY, K.:
Digoxin "receptors" in neonates. An explanation of less sensitivity to digoxin than in adults.
Clin. Pharmacol. Ther. 28, 346 - 349 (1980)
144. KIM, D., MARSH, J. D., BARRY, W. B., SMITH, T. W.:
Effects of growth in low potassium medium or ouabain on membrane Na, K-ATPase, cation transport and contractility in cultured chick heart cells.
Circ. Res. 55, 39 - 48 (1984)
145. KIMELBERG, H. K., PAPAHAJDOPOULOS, P.:
Phospholipid requirement for $(Na^{+}K^{+})$ -ATPase activity.
Biophys. Acta 282, 277 (1972)
146. KJELDSSEN, K., NØRGAARD, A., CLAUSEN T.:
Age-dependent changes in the number of 3H -ouabain binding sites in rat soleus muscle.
Biochim. Biophys. Acta 686, 253 - 256 (1982)
147. KJELDSSEN, K., NØRGAARD, A., CLAUSEN, T.:
The age-dependent changes in the number of 3H -ouabain binding sites in mammalian skeletal muscle.
Pflügers Arch. 402, 100 - 108 (1984)
148. KJELDSSEN, K., NØRGAARD, A., CLAUSEN, T.:
Effect of K-depletion on 3H -ouabain binding and Na-K-contents in mammalian skeletal muscle.
Acta Physiol. Scand. 122, 103 - 117 (1984)

149. KJELDSEN, K., NØRGAARD, A., CLAUSEN, T.:
Changes in the number of Na-K-pumps (digitalis-receptors) in skeletal muscle may in part account for the variations in digitalis toxicity with age, K-deficiency and the thyroid status.
Eur. Heart J. 5 (Abst. Suppl. 1), 43 (1984)
150. KJELDSEN, K., GOTZSCHE, C.O., NØRGAARD, A., THOMASSEN, A., CLAUSEN, T.:
The effect of thyroid function on number of Na-K-pumps in human skeletal muscle.
Lancet 8393, 8 - 10 (1984)
151. KRAWIETZ, E., POPPERT, D., ERDMANN, E., GLOSSMANN, H., STRUCK, C. J., KONRAD, C.:
 β -adrenergic receptors in guinea pig myocardial tissue.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 295, 215 - 224 (1976)
152. KUHLMANN, U., SIEGENTHALER, W.:
Pathophysiologie des Kaliumhaushalts.
In: Siegenthaler, W. (Hrsg.), Klinische Pathophysiologie
Thieme Verl. Stuttgart, 218 - 225 (1979)
153. KUNAU, R. T., STEIN, J. H.:
Disorders of hypo- and hyperkalemia.
Clin. Nephrology 4, 173 - 190 (1977)
154. KUSCHINSKY, G., LÜLLMANN, H.:
Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie.
Thieme Verlag, Stuttgart, (1978)
155. LANGER, G. A., SERENA, S. D.:
Effects of strophanthidin upon contraction and ionic exchange in rabbit ventricular myocardium: Relation to control of active state.
J. Molec. Cell. Cardiol. 1, 65 - 90 (1970)
156. LANGER, G. A.:
Effects of digitalis on myocardial ionic exchange.
Circulation 46, 180 - 187 (1972)
157. LANGER, G. A.:
Relationship between myocardial contractility and the effect of digitalis on ionic exchange.
Fed. Proc. 36, 2231 - 2234 (1977)
158. LANGER, G.:
The role of calcium in the control of myocardial contractility.
J. Molec. Cell Cardiol. 12, 231 - 239 (1980)
159. LATSCHA, H. P., KLEIN, H. A.:
Chemie für Mediziner, Thermodynamik.
Springer Verl. Berlin, Heidelberg, New York, 135 - 143 (1975)
160. LAUF, P. K.:
Antigen-antibody reactions and cation transport in biomembranes: Immunophysiological aspects.
Biochim. Biophys. Acta 415, 173 - 229 (1975)

161. LAUF, P. K., JOINER, C. H.:
Increased potassium transport and ouabain binding in human Rh_{null}
red blood cells.
Blood. 48, 457 - 468 (1976)
162. LAWSON, D. H., HENRY, D. A., LOWE, J. M., GRAY, J. M.B.,
MORGAN, H. G.:
Severe hypokalaemia in hospitalized patients.
Arch. Int. Med. 139, 978 - 980 (1979)
163. LEE, C. O., KANG, D. H., SOKOL, J. H., LEE, K. S.:
Relation between intracellular Na⁺-ion activity and tension of sheep
cardiac purkinje fibres exposed to dihydro-ouabain.
Biophys. J. 29, 315 - 330 (1980)
164. LEE, K. S., KLAUS, W.:
The subcellular basis for the mechanism of inotropic action of
cardiac glycosides.
Pharmacol. Rev. 23, 193 - 261 (1971)
165. LEFKOWITZ, R. J.:
Isolated hormone receptors. Physiology and clinical implications.
N. Engl. J. Med. 288, 1061 - 1066 (1973)
166. LEHMANN, H.-U., WITT, E., TEMMEN, L., HOCHREIN, H.:
Lebensbedrohliche Digitalisintoxikationen mit und ohne saluretische
Zusatztherapie; Intensivmedizinische Studie.
Dtsch. Med. Wschr. 103, 1566 (1978)
167. LEHMANN, H.-U., WITT, E., TEMMEN, L., HOCHREIN, H.:
Digitoxische Herzrhythmusstörungen in Abhängigkeit zur Höhe der
Kalium- und Kreatininkonzentration im Blutserum.
Intensivmed. 17, 153 - 158 (1980)
168. LESNIAK, M. A., GORDON, P., ROTH, J., GAVIN, J. R.:
Binding of ¹²⁵I-human growth hormone to specific receptors in human
cultured lymphocytes. Characterisation of the interaction and a
sensitive radioreceptor assay.
J. Biol. Chem. 249, 1661 - 1667 (1974)
169. LEVY, B.:
Selective beta receptor drug interactions. Search for new drugs.
Ed. Rubin, A. A., Pub. Marcel Dekker, 233 - 259 (1972)
170. LIN, M. H., AKERA, T.:
Increased (Na⁺, K⁺)-ATPase concentrations in various tissues of rats
caused by thyroid hormone treatment.
J. Biol. Chem. 253, 723 - 726 (1978)
171. LIVERPOOL THERAPEUTICS GROUP:
Use of Digitalis in general practice.
Br. Med. J. 2, 673 - 675 (1978)
172. LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N. J., FARR, A.L., RANDALL, R.J.:
Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265 - 275 (1951)

173. LÜDERITZ, B., BOLTE, H. D., STEINBECK, G.:
Einzelfaserpotentiale und zelluläre Elektrolytkonzentrationen des Ventrikelmyokards bei chronischem Kaliummangel.
Klin. Wochenschr. 49, 369 (1971)
174. LÜLLMANN, H., PETERS, T., RAVENS, U.:
Studies on the kinetics of ^3H -ouabain uptake and exchange in the isolated papillary muscle of the guinea-pig.
Br. J. Pharmac. 53, 99 - 107 (1975)
175. LUKAS, D.:
Binding of digitoxin, digoxin, their genins and related digitoxosides to human plasma protein.
In: Storstein, O. (ed.), Symposium on digitalis.
Gyldendal Norsk, Oslo, 31 - 48 (1973)
176. MALNIC, G., MELLO-AIRES, M., GIEBISCH, G.:
Potassium transport across renal distal tubular during acid-base disturbances.
Am. J. Physiol. 221, 1192 (1971)
177. MANERY, J. F., DRYDEN, E. E., STILL, J. S., MADAPALLIMATTAM, G.:
Enhancement (by ATP, insulin and lack of divalent cations) of ouabain inhibition of cation transport and ouabain binding in frog skeletal muscle; effect of insulin and ouabain on sarcolemmal $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -Mg-ATPase.
Can. J. Physiol. Pharmacol. 55, 21 - 33 (1977)
178. MASON, D. T., FOERSTER, J. M.:
Side effects and intoxication of cardiac glycosides: manifestations and treatment. In: Greeff, K. (ed): Handbook of experimental pharmacology, Vol. 561 II: Cardiac glycosides.
Springer Verl., Berlin, Heidelberg, New York, 275 -297 (1981)
179. MAYAHARA, H., OGAWA, K.:
Ultracytochemical localization of ouabain sensitive, potassium-dependent p-nitrophenyl-phosphatase activity in rat kidney.
Acta Histochem. Cytochem. 13, 90 - 102 (1980)
180. MAYAHARA, H., FUJIMOTO, K., ANSO, T., OGAWA, K.:
A new one-step method for the cytochemical localization of ouabain-sensitive, potassium-dependent p-nitrophenylphosphatase activity.
Histochemistry 67, 125 - 138 (1980)
181. MCCALL, D.:
Cation exchange and glycoside binding in cultured rat heart cells.
Am. J. Physiol. 236, 687 - 695 (1979)
182. MCCUBBIN, W. D., KAY, C. M.:
Calcium induced conformational changes in the troponin-tropomyosin complexes of skeletal and cardiac muscle and their roles in the regulation of contraction-relaxation.
Acc. Chem. Res. 13, 185 - 192 (1980)

183. MEINERTZ, T., NAWRATH, H., SCHOLZ, H.:
Possible role of cyclic AMP in the relaxation process of mammalian heart; effects of dibutyryl cyclic AMP and theophylline on potassium contractures in cat papillary muscles.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 293, 129 - 137 (1976)
184. MELDGAARD, L., STEINESS, E., WALDORFF, S.:
Time course of ouabain uptake in isolated myocardial cells.
Br. J. Pharmacol. 73, 341 - 345 (1981)
185. MICHAEL, L. H., SCHWARTZ, A., WALLICK, E. T.:
Nature of the transport adenosine triphosphatase-digitalis complex: XIV. Inotropy and cardiac glycoside interaction with Na⁺, K⁺-ATPase of isolated cat papillary muscles.
Molec. Pharmacol. 16, 135 (1979)
186. MICHEL, D.:
Digitalistherapie im Alter.
Folge 3: Therapieüberwachung, Digitalisintoxikationen.
Fortschr. Med. 99, 1026 - 1028 (1981)
187. MOORE, W. V., WOLFF, J.:
Thyroid-stimulating hormone binding to beef thyroid membranes. Relation to adenylate cyclase activity.
J. Biol. Chem. 249, 6255 - 6263 (1974)
188. MORRISON, J., KILLIP, T.:
Hypoxemia and digitalis toxicity in patients with chronic lung disease.
Circulation (Suppl. II) 44, 41 (1971)
189. NETTER, F. H.:
Herz.
Ciba coll. Med. Ill. 1, Thieme Verl. Stuttgart, 108 - 109 (1976)
190. NØRGAARD, A., KJELDSEN, K., CLAUSEN, T.:
Potassium depletion decreases the number of ³H-ouabain binding sites and the active Na⁺-K⁺-transport in skeletal muscle.
Nature 293, 739 - 741 (1981)
191. NØRGAARD, A., KJELDSEN, K., CLAUSEN, T.:
K⁺ depletion and Na⁺ pump density.
Nature 295, 717 - 718 (1982)
192. NØRGAARD, A., KJELDSEN, K., HANSEN, O.:
(Na⁺+K⁺)ATPase activity of crude homogenates of rat skeletal muscle as estimated from their K⁺ dependent 3-O-methylfluorescein phosphatase activity.
Biochim. Biophys. Acta 770, 203 (1984)
193. NØRGAARD, A., KJELDSEN, K., HANSEN, O., CLAUSEN, T.:
A simple and rapid method for the determination of the number of ³H-ouabain binding sites in biopsies of skeletal muscle
Bioch. and Biophys. res. comm. 111/1, 319 - 325 (1983)

194. NØRGAARD, A., KJELSEN, K., CLAUSEN, T.:
A method for the determination of the total number of ^3H -ouabain binding sites in biopsies of human skeletal muscle.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 44, 509 - 518 (1984)
195. OKARMA, T. B., TRAMELL, P., KALMAN, S. M.:
The surface interaction between digoxin and cultured heart cells.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 183, 559 - 576 (1972)
196. OLSON, R. E., ELLENBOGEN, E., IYENGAR, R.:
Cardiac myosin and congestive heart failure in the dog.
Circulation 24, 475 - 482 (1961)
197. ONJI, T., LIU, M. S.:
Ouabain receptor in isolated adult dog heart myocytes.
Arch. Biochem. Biophys. 207, 148 - 156 (1981)
198. PASTERNAK, G. W., SNYDER, S. H.:
Opiate receptor binding: enzymatic treatments that discriminate between agonist and antagonist interactions.
Mol. Pharmacol. 11, 478 - 484 (1975)
199. PERRONE, J. P., BLOSTEIN, R.:
Asymmetric interaction of inside-out and rightside-out erythrocyte membrane vesicles with ouabain.
Biochim. Biophys. Acta 291, 680 - 689 (1973)
200. PHILIPP, G.:
Spezifische Herzglykosidrezeptoren. Bindungsstudien mit ^3H -g-Strophanthin an verschiedenen Organen und Zellmembranen der Ratte und des Meerschweinchens.
Promotionsschrift, Universität München (1980)
201. PITTS, B. J. R., SCHWARTZ, A.:
Improved purification and partial characterization of $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ from cardiac muscle.
Biochim. Biophys. Acta 401, 184 - 195 (1975)
202. POLLACK, L. R., TATE, F. R., COOK, J. S.:
 $\text{Na}^+, \text{K}^+\text{-ATPase}$ in HeLa cells after prolonged growth in low K^+ or ouabain.
J. Cell. Physiol. 106, 85 - 97 (1981)
203. POWELL, J. R., BRODY, M. J.:
Identification and specific blockade of two receptors for histamine in the cardiovascular system.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 196, 1 - 14 (1976)
204. PRESEK, P.:
Spezifische Herzglykosidrezeptoren. Quantitative Aspekte der Bindung von g-Strophanthin an Zellmembranpräparationen verschiedener menschlicher Gewebe.
Dissertation, Universität München (1982)

205. REFKE, K., PORTIUS, H. J.:
Über die Identität der Ionenpumpen-ATPase in der Zellmembran des
Herzmuskels mit einem Rezeptorenzym.
Experientia 19, 1 - 7 (1963)
206. REUTER, H.:
Exchange of calcium ions in the mammalian myocardium.
Circ. Res. 34, 599 - 605 (1974)
207. REUTER, H., SCHOLZ, H.:
A study of the ion selectivity and the kinetic properties of the
calcium dependent slow inward current in mammalian cardiac muscle.
J. Physiol. 264, 49 - 62 (1977)
208. RIECKER, G.:
Störungen des Wasser- und Elektrolytstoffwechsels bei Nierenkrank-
heiten. In: Schwiegl, H. (Hrsg.) Handbuch der inneren Medizin.
Springer Verl. Berlin, Heidelberg, New York 8/1, 760 (1968)
209. RIECKER, G.:
Lebensbedrohliche Störungen des Kaliumgehalts.
Verh. Dt. Ges. Inn. Med. 80, 873 - 879 (1974)
210. RIECKER, G.:
Therapie der chronischen Herzinsuffizienz. In: Klinische Kardiologie.
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 611 - 624 (1982)
211. RIECKER, G.:
Kardiologie.
Munch. med. Wschr. 26, MMW Medizin Verl. München, 607 - 609 (1983)
212. RIETBROCK, N., KEWITZ, H.:
Wahl des Herzglykosids.
MMW 122, 775 - 776 (1980)
213. RIETBROCK, N., WOODCOCK, B. G.:
On the rational choice of cardiac glycoside.
TIPS 2, 206 - 208 (1981)
214. RIETBROCK, N., WOODCOCK, B. G., KUHLMANN, J.:
Nebenwirkungen und Interaktionen mit anderen Pharmaka.
In: Erdmann E.: Therapie mit Herzglykosiden.
Springer Verl., Berlin, Heidelberg, New York, 75 - 86 (1983)
215. RODENSKY P. L., WASSERMANN, F.:
Observations on digitalis intoxications.
Arch. Intern. Med. 108, 171 - 188 (1961)
216. ROSSI, B., VUILLEUMIER, P., GACHE, C., BALERNA, M., LAZDUNSKI, M.:
Affinity labeling of the digitalis receptor with p-nitrophenyl-
triazene-ouabain, a highly specific alkylating agent.
J. Biol. Chem. 255, 9936 - 9941 (1980)
217. RUBYTHON, E. J., MORGAN, D. B.:
Effect of hypokalaemia on the ouabain-sensitive sodium transport and
the ouabain-binding capacity in human erythrocytes.
Clinical Science 64, 177 - 182 (1983)

218. RUOHO, A., KYTE, J.:
Photoaffinity-labelling of the ouabain binding site on
(Na⁺ + K⁺)-ATPase.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 2352 - 2356 (1974)
219. SACKMANN, E.:
Dynamische Struktur von Lipiddoppelschichten und biologischen
Membranen: Biophysik, Hrg.: Hoppe, W., Lohman, W., Markl, H. Ziegler, H.
Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 316 - 318 (1977)
220. SCATCHARD, G.:
The attractions of proteins for small molecules and ions.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 51, 660 - 672 (1949)
221. SCHATZMANN, H.-J.:
Herzglykoside als Hemmstoffe für den aktiven Kalium- und Natrium-
transport durch die Erythrocytenmembran.
Helv. Physiol. Acta 11, 346 - 354 (1953)
222. SCHÄFER, G. E., WERNER, E.:
Kalium-Mangel durch Diuretika-Medikation.
Schwep. Med., Selecta-Verl. Planegg vor München 1, (1980)
223. SCHERNTHANER, G., PRAGER, R., WEISSEL, M., HÜFER, R.:
Decreased insulin receptor binding in Hyperthyroidism.
Klin. Wochenschr. 62, 1074 - 1080 (1984)
224. SCHÖBER, O. BOSSALLER, C., LEHR, L., HUNDESHAGEN, H.:
Altered potassium homeostasis in Crohn's disease.
Eur. J. Nuc. Med. 8, 245 - 249 (1983)
225. SCHÖNER, W., VON ILBERG, C., KRAMER, R., SEUBERT, W.:
On the mechanism of Na⁺ - and K⁺-stimulated hydrolysis of ATP.
1. Purification and properties of a Na⁺ - and K⁺-activated ATPase
from ox brain.
Eur. J. Biochem. 334 - 343 (1967)
226. SCHÜREN, K. P., RIETBROCK, N.:
Digitalisbehandlung in Deutschland.
Dtsch. med. Wschr. 107, 1935 - 1938 (1982)
227. SCHWARTZ, A., MATSUI, H., LAUGHTER, A. H.:
Tritiated digoxin binding to (Na⁺ + K⁺)-activated ATPase possible
allosteric site.
Science 159, 324 - 325 (1968)
228. SCHWARTZ, A., LINDENMAYER, G., ALLEN, J. C.:
The sodium-potassium adenosine triphosphatase. Pharmacological,
physiological and biochemical aspects.
Pharmacol. Rev. 27, 3 - 134 (1975)
229. SCHWARTZ, A.:
Is the cell membrane Na⁺ + K⁺-ATPase enzyme system the pharmaco-
logical receptor for digitalis?
Circ. Res. 39, 2 - 7 (1976)

230. SCHWARTZ, A.:
Sodium-potassium adenosine triphosphatase - A receptor for digitalis?
Biochem. Pharmacol. 25, 237 - 239 (1976)
231. SHAPIRO, W.:
Correlative studies of serum digitalis levels and the arrhythmias of digitalis intoxication.
Am. J. Cardiol. 41, 852 - 859 (1978)
232. SHARMA, V. K., DASGUPTA, S. R., BANERJEE, S. P.:
³H-Ouabain binding to denervated and innervated skeletal muscle.
Eur. J. Pharmacol. 43, 273 - 276 (1977)
233. SINGER, S. J.:
The molecular organisation of membranes.
Ann. Rev. Biochem. 43, 805 - 833 (1974)
234. SINGER, S., CONRAD, M.:
The structure of cell membranes. In: Cell membrane function and dysfunction of vascular tissue. Edit.: Godfraind, T., Meyer, P.
Elsevier, North-Holland, 1 - 12 (1981)
235. SKOU, J. C.:
The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves.
Biochim. Biophys. Acta. 23, 349 - 401 (1957)
236. SKOU, J. C.:
Enzymatic basis for active transport of Na⁺ and K⁺ across cell membranes.
Physiol. Rev. 45, 596 - 617 (1965)
237. SKOU, J. C., NØRBY, J. G.:
Na, K - ATPase, structure and kinetics.
Academic Press, London, New York, San Francisco (1979)
238. SMITH, T. W., HABER, E.:
Digitalis. Clinical value of the radioimmunoassay of the digitalis glycosides.
Pharmacol. Rev. 25, 219 - 228 (1970)
239. SMITH, T. W., HABER, E.:
Digitalis (Fourth of four parts).
N. Engl. J. Med. 289, 1126 - 1129 (1973)
240. SMITH, T. W., WAGNER, H., STROEBERG, A. D., YOUNG, M.:
Characterisation of solubilized myocardial (Na⁺+K⁺)ATPase.
Ann. NY. Acad. Sci. 242, 53 - 68 (1974)
241. SMITH, T. W.:
Digitalis toxicity: Epidemiology and clinical use of serum concentration measurements.
Am. J. Med. 58, 470 - 475 (1975)

242. SMITH, T. W., BRAUNWALD, E.:
The Management of heart failure
In: Braunwald E.(ed.) Heart disease. Vol. 1. A Textbook of
Cardiovascular Medicine.
W.B. Saunders, Philadelphia, London, Toronto, 509 -570 (1984)
243. SODEMAN, W. A.:
Diagnosis and treatment of digitalis toxicity.
N. Engl. J. Med. 273, 35 - 37 (1965)
244. SOYKA, L. F.:
Pediatric clinical pharmacology of digoxin.
Pediatr. Clin. North. Am. 28, 203 - 215 (1981)
245. STAHL, W. L.:
Role of phospholipids in the Na^+ , K^+ -stimulated adenosine
triphosphatase system of brain microsomes.
Arch. Biochem. Biophys. 154, 56 - 67 (1973)
246. STEINBECK, G., ERDMANN, E., LÜDERITZ, B., BOLTE, H. D.:
Einfluß herzaktiver Glykoside auf die intrazelluläre Kalium- und
Natriumkonzentration des Myokards bei chronischem Kaliummangel.
Verh. Dtsch. Ges. Kreislaufforsch. 39, 170 - 174 (1973)
247. STEINNESS, E., OLESCH, K. H.:
Cardiac arrhythmias induced by potassium loss during maintenance
digoxin therapy.
Br. Heart. J. 38, 167 - 172 (1976)
248. STEINNESS, E.:
Digoxin toxicity compared with myocardial digoxin and potassium
concentration.
Br. J. Pharmacol. 63, 233 - 237 (1978)
249. TANIGUCHI, K., IIDA, S.:
The role of phospholipids in the binding of ouabain to sodium- and
potassium-dependent adenosine triphosphatase.
Mol. Pharmacol. 9, 350 - 359 (1973)
250. THEISEN, K.:
Klinische Pathophysiologie und Pathogenese digitalisbedingter Herz-
rhythmusstörungen.
Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 740 - 753 (1981)
251. TYSON, I., GENNA, S., JONES, R. L.:
Body potassium measurements with a total body counter.
J. Nucl. Med. 11, 255 (1970)
252. VIGNE, P., FRELIN, C., LAZDUNSKI, M.:
Ontogeny of the $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPase}$ during chick skeletal myogenesis.
J. Biol. Chem. 257, 5380 - 5384 (1982)
253. WARD, J. P. T., CAMERON, I. R.:
Adaption of the cardiac muscle sodium pump to chronic potassium
deficiency.
Cardiovascular Research 18, 257 - 263 (1984)
254. WASER, P. G., VOLKART, O.:
Wirkung von Herzglykosiden auf Actomyosin.
Helv. Physiol. Acta. 12, 12 - 22 (1954)

255. WEILAND, G. A., MOLINOFF, P. B.:
Quantitative analysis of drug-receptor interactions.
I. Determination of kinetic and equilibrium properties.
Life Sciences 29, 313 - 330 (1981)
256. WEINMANN, J., HASFORD, J., KUHLMANN, J., BIPPUS, P. H., LICHEY, J.,
RIETBROCK, N.:
Digoxinkonzentrationen in Plasma und Gewebe. Eine post-mortem-Unter-
suchung.
Med. Klin. 74, 613 - 619 (1979)
257. WERDAN, K., BAURIEDL, G., BOZSIK, M., KRAWIETZ, W., ERDMANN, E.:
Effects of vanadate in cultured rat heart muscle cells. Vanadate
transport, intracellular binding and vanadate-induced changes in
beating and in active cation flux.
Biochim. Biophys. Acta 597, 364 - 383 (1980)
258. WERDAN, K.:
Herzglykosid-Rezeptoren der intakten Herzmukelzelle - Eigenschaften
und deren experimentelle Beeinflussung.
Habilitationsschrift, Univ. München, (1984)
259. WERDAN, K., SCHNEIDER, G., KRAWIETZ, W., ERDMANN, E.:
Chronic exposure to low K^+ increases cardiac glycoside receptors in
cultured cardiac cells: different responses of cardiac muscle and non
muscle cells from chicken embryos.
Biochem. Pharmacol. 33/7, 1161 - 1164 (1984)
260. WERDAN, K., WAGENKNECHT, B., ZWISSLER, B., BROWN, L., KRAWIETZ, W.,
ERDMANN, E.:
Cardiac glycoside receptors in cultured heart cells.
I. Charakterization of one single class of high affinity receptors in
heart muscle cells from chick embryos.
Biochem. Pharmacol. 33, 55 - 70 (1984)
261. WILKINSON, P. R., HESP, R., ISSLER, H., RAFTERY, E. D.:
Total body and serum potassium during prolonged thiazide therapy for
essential hypertension.
Lancet I, 759 - 765 (1975)
262. WITHERING, W.:
An account of the foxglove, and some of its medical uses: with
practical remarks on dropsy and other diseases.
M. Swinney, Birmingham (1785)
263. WOERLE, R., WOLF, G.:
Cavia aperea porcellus.
In: Siewing R.: GroRes Zoologisches Praktikum, Band 2193
Fischer Verlag, 68 (1976)
264. YAMAMOTO, S., AKERA, T., BRODY, T. M.:
Tissue concentration of Na^+ , K^+ -ATPase and the positive inotropic
action of ouabain in guinea-pig heart.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 217, 701 - 707 (1981)
265. YAMAMOTO, S., ALANNA, A. L., GREEFF, K.:
Inotropic effects and Na^+ , K^+ -ATPase inhibition of ouabain in
isolated guinea-pig atria and diaphragm.
Eur. J. Pharmacol. 71, 437 - 446 (1981)

7. DANKSAGUNG

Ich danke meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. E. Erdmann, für seine großzügige Förderung und Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Lindsay Brown, der mich bei der Entstehung dieser Arbeit vorbildlich betreute. Seine Anregungen und die angenehme Zusammenarbeit haben entscheidend zum Gelingen meiner Dissertation beigetragen.

Ebenso danke ich Herrn Professor Dr. U. Büll, Leiter der Nuklearmedizinischen Abteilung der Radiologischen Klinik Großhadern für die freundliche Erlaubnis zur Ganzkörperkaliummessung.

Für die engagierte Mitarbeit von P. Lang, Dr. W. Münzing, A. Reichl und H. Schäffler sei herzlichst gedankt.

8. LEBENS LAUF

Geboren wurde ich am 26. Februar 1956 in Heidenheim, Baden-Württemberg, als zweiter Sohn des Diplom Ingenieurs Heinz Wagner und seiner Frau Elisabeth, geb. Geiger.

1962 - 1966 Volksschule in Regensburg

1966 - 1976 Goethe-Gymnasium, Regensburg

1976 Abitur

1977 - 1978 Berufsfachschule für Krankenpflege am
Krankenhaus St. Josef, Regensburg

1979 - 1985 Studium der Humanmedizin an den Universitäten
München und Göttingen, an den Medizinischen
Hochschulen Homburg und Lübeck

1981 heiratete ich die Pharmaziestudentin Doris Sachs

1982 Geburt unserer Tochter Jasmin

1982 - 1985 Doktorarbeit an der Medizinischen Klinik I
der Ludwig-Maximilians-Universität, München,
Klinikum Großhadern, Labor Prof. Dr. med.
E. Erdmann

1985 Staatsexamen und Approbation .
Wissenschaftlicher Assistent an der Medizinischen
Klinik I, Klinikum Großhadern,
Direktor: Prof. Dr. med. G. Riecker

